

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA FORFICATA*

HEROS HORST

Florianópolis
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA FORFICATA*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado por HEROS HORST para obtenção do Grau de Bacharel em Química.

Orientador: Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis
2005

É a vida...

Dedico este trabalho aos meus pais, Holdi e Zenir “in memoriam”, e aos meus irmãos Henri e Heron

Agradecimentos

A Deus porque sozinho não seria capaz

Aos professores Moacir Geraldo Pizzolatti e Inês Maria Costa Brighente, pela orientação e a pelo incentivo.

Aos membros da banca, Professor Dr. José Carlos Youssef e à aluna de doutorado Ana Karina Tímbola pela contribuição.

Ao professor Daniel de Barcellos Falkenberg pela identificação botânica da espécie vegetal estudada.

Aos meus pais “in memorian” Holdi e Zenir pela educação e ensinamentos que me passaram ao longo de suas vidas OBRIGADO.

A Marlete, que carinhosamente me agüentou nesta fase da minha vida.

Aos meus irmãos Heron e Henri que indiscutivelmente formaram comigo uma grande família unida pela força e companheirismo.

Aos amigos de laboratório Cristian, Verdi, Analice, Munique, Fabiana, Andressa, Henrique, Beatriz, Michele, Larissa, Roberta e Aline.

Aos professores e funcionários do Curso de Graduação em Química pelo apoio, colaboração e valiosa convivência a qual contribuiu para minha formação.

Ao PIBIC/CNPq, pelo suporte financeiro.

Aos inúmeros amigos que participaram de forma indireta nesta jornada.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos	1
1.2 O metabolismo vegetal.....	3
1.3 Espécie vegetal <i>Bauhinia forficata</i>	4
1.4 Flavonóides.....	5
1.5 OBJETIVOS	9
1.5.1 Objetivo Geral	9
1.5.2 Objetivos Específicos	9
2. PARTE EXPERIMENTAL	10
2.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL <i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK.....	10
2.1.1 Materiais.....	10
2.1.2 Métodos e instrumentação	11
2.1.2.1 Espectroscopia de infravermelho	11
2.1.2.2 Ressonância magnética nuclear	11
2.1.3 Coleta e identificação da planta	11
2.1.4 Obtenção dos extratos	12
2.1.5 Isolamento dos flavonóides das folhas de <i>Bauhinia forficata</i>	13
2.1.6 Caracterização dos compostos isolados	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL <i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK.....	19

3.1.1 Identificação do kaenferol	20
3.1.2 Identificação dos flavonóides glicosilados.....	21
3.1.2 Identificação de um dissacarídeo.....	26
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL <i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK.....	30
6 BIBLIOGRAFIA	32
7 ANEXO – Coleção de espectros	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Espécie vegetal <i>Bauhinia forficata</i>	5
Figura 2	Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.	5
Figura 3	Esquema simplificado da rota biossintética dos flavonóides.	7
Figura 4	Representação de uma coluna cromatográfica	15
Figura 5	CCF das substâncias isoladas.....	19
Figura 6	Estrutura química do composto 1 (kaenferol).	20
Figura 7	Hidrólise ácida	21
Figura 8	Estrutura química do composto 3 (kaenferol-7-O-(α)- ramnosídeo)	22
Figura 9	Estrutura química do composto 4 (kaenferol-3,7-O-(α)- diramnosídeo) e do composto 5 (quercetina-3,7-O-(α)- diramnosídeo).....	23
Figuras 10 e 11	Comprovação por HPLC da purificação da Fr. 75	24
Figura 12	Estrutura química do composto 6 kaenferol-3-O-(α)-glicosídeo- (1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo.....	26
Figura 13	Acetilação de um dissacarídeo.....	27
Figura 14	Mecanismo da reação de acetilação.	27
Figura 15	Espectro de IV do provável dissacarídeo	28
Figura 16	Espectro do produto de reação de acetilação do provável dissacarídeo	28
Fluxograma 1	Preparação das frações solúveis da solução hidroalcolica das folhas de <i>B. forficata</i>	12
Fluxograma 2	Representação esquemática do isolamento dos compostos da Fr. AcOEt.....	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistema de eluição utilizado para coluna cromatográfica da Fr. AcOEt 15
Tabela 2	Dados de RMN ^1H e ^{13}C do kaenferol (1) e dos glicosídeos 3, 4 e 6, registrados em DMSO- d_6 usando aparelho e 600 MHz para hidrogênio e 150 MHz para carbono-13. Deslocamentos químicos em δ (δ_{H} e δ_{C}) e constantes de acoplamento (J, entre parênteses) em Hz. Sinais relacionados com espectros de HMBC e HMQC da literatura. 29

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>B. forficata</i>	<i>Bauhinia forficata</i>
Co-A	Acetilcoenzima A
OMS	Organização Mundial da Saúde
PF	Ponto de fusão
KBr	Brometo de potássio
IV	Espectrometria no Infravermelho
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
δ	Deslocamento químico
J	Constante de acoplamento (Hz)
MHz	Mega Hertz
Hz	Hertz
ppm	partes por milhão
HMBC	“ ¹ H – Detected Heteronuclear Multiple Bond Connectivity”
HMQC	“ ¹ H – Detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
H ₂ O	Água
EtOH	Etanol
AcOEt	Acetato de etila
n-BuOH	n-butanol
Fr.	fração
CCF	Cromatografia em camada fina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
SiO ₂	Sílica
Rf	Fator de retenção

RESUMO

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Leguminosae, as quais são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 300 espécies¹⁰. Algumas espécies do gênero *Bauhinia* são utilizadas como remédio na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo a África, Ásia e América Central e do Sul¹¹.

A *Bauhinia forficata*, conhecida popularmente como “pata de vaca” entre os inúmeros usos na medicina popular destaca-se no tratamento de Diabetes. Diante deste fato, este trabalho teve os seguintes objetivos: 1. isolar e identificar os compostos das folhas desta planta; 2. separação dos metabólitos secundários presente no extrato bruto; 3. enfatizar as técnicas de identificação por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C dos constituintes desta espécie vegetal.

Um novo composto isolado foi reconhecido como sendo um dissacarídeo através das análises preliminares de IV, RMN ^1H e ^{13}C . A completa elucidação estrutural requer outras análises espectroscópicas que estão em andamento.

Procedimentos de modificação estrutural como hidrólise de flavonóides O-heterosídeos e acetilação de um dissacarídeo foram usados para identificação de elucidação das estruturas dos compostos da espécie vegetal estudada.

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência para analisar o grau de pureza de uma fração contendo kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo e quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo, que são difíceis de serem separados por procedimentos cromatográficos simples mostrou-se de grande valia no que diz respeito a misturas de compostos com fator de retenção parecidos e estruturas que se diferenciam por uma hidroxila.

O fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico das folhas da *B. forficata* resultou no isolamento e identificação de kaenferol e quercetina, além de um novo dissacarídeo.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde¹.

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade das plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública e os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações, toxidez, interações com outras drogas devem ser tratados com cautela. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipiente, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais².

O uso do potencial das plantas medicinais no combate a doenças, há muito vem sendo um desafio aos pesquisadores. As plantas são uma importante fonte de constituintes biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para desenvolvimento de fármacos. Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal³.

Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada.

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas. Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos e 1100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais⁴.

Atualmente há a necessidade de se buscar alternativas para superar a dependência externa, principalmente quando se confrontam os altos preços médios praticados no Brasil em comparação com aqueles praticados nos países desenvolvidos. O panorama brasileiro nessa área mostra que 84% de todos os fármacos são importados e que 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais⁵.

Nesse quadro, confronta-se o hemisfério norte rico em tecnologia, mas pobre em recursos genéticos e o hemisfério sul pobre em tecnologia, mas riquíssimo na diversidade biológica. Estima-se que um gene potencialmente útil originado na biodiversidade do hemisfério sul pode representar negócios de US\$ 1 bilhão no norte e que o germoplasma vegetal do sul contribua com valores estimados em US\$ 66 bilhões por ano somente na economia dos EUA⁶.

O ritmo atual da ação antrópica esta levando a extinção de inúmeras espécies vegetais das florestas. Esse fato leva à necessidade de se estabelecer políticas e ações de conservação e, ao mesmo tempo, de se obter grandes quantidades de matéria-prima vegetal para obtenção de substâncias dela derivadas.

Os avanços científicos na área da biologia a partir da metade do século XX proporcionaram o desenvolvimento de dezenas de técnicas biotecnológicas, que estão facilitando a realização de estudos de genética e de melhoramentos de plantas. Nesse contexto, podem ser empregadas ferramentas biotecnológicas associadas ao uso de marcadores moleculares para caracterização e monitoramento da diversidade genética, visando a sua utilização e conservação. A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico ou para o desenvolvimento de novos medicamentos inspirados em seus metabólitos secundários ou por processo transgênicos, tem se mostrado uma forma não convencional de produção de matérias primas vegetais, que estão sendo exploradas de forma mais freqüente⁷. A matéria-prima de plantas medicinais é obtida basicamente através do cultivo ou do extrativismo.

Nesse contexto, é importante ressaltar que essas possibilidades são dois extremos do processo de domesticação de espécies vegetais. A domesticação das plantas pode ser entendida como um processo coevolutivo em que, através da seleção, alguns tipos mais apropriados para as necessidades ou interesses do homem são favorecidos, com objetivo de tornar essas populações mais úteis para o mesmo. Paralelamente à domesticação de uma determinada espécie, o homem produz alterações na paisagem, visando torná-la mais produtiva ou conveniente para sua ação⁷.

1.2 O metabolismo vegetal

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, essenciais a todos os seres vivos, são metabólitos primários. Nesse grupo estão incluídos os lipídeos, protéicos e glicídeos, com funções vitais bem definidas. Os produtos do metabolismo primário originam o segundo grupo de compostos químicos – os metabólitos secundários que apresentam uma vastíssima variedade estrutural e marcantes atividades biológicas. São encontrados em quantidades variadas desde traços a altas

concentrações dependendo da biogênese da planta. Os metabólitos secundários atuam primeiramente na defesa do vegetal, agindo como dissuasórios alimentares e como toxinas. Os melhores exemplos de dissuasórios alimentares são os taninos, freqüentes em frutos verdes. Esses produtos adstringentes são responsáveis pela preservação do fruto até o pleno desenvolvimento da semente, quando, então, desaparecem⁷.

Muitas toxinas como, por exemplo, os alcalóides, têm sabor amargo e desagradável fazendo com que, em algumas situações, os herbívoros reconheçam e evitem as plantas que as contém. Por outro lado, alguns metabólitos secundários atuam de maneira oposta, atraindo insetos, pássaros, morcegos e até mesmo ratos, responsáveis pela polinização de muitas plantas. Nesse grupo incluem-se os pigmentos (flavonóides, antocianinas e betalaínas) e os óleos voláteis (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides)⁸⁻⁹.

1.3 Espécie vegetal *Bauhinia forficata*

Bauhinia forficata, conhecida popularmente como “pata de vaca” (figura 1), é uma árvore da família Leguminosae, tem porte médio (5 a 9 metros) folhas bipartidas lembrando a pata de uma vaca, flores de coloração branca e frutos do tipo vagem linear. É encontrada principalmente nas regiões do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, e destaca-se por sua importância etnomédica devido as suas propriedades hipoglicêmica, diurética e depurativa¹²⁻¹³.

O gênero *Bauhinia* pode ser classificado do ponto de vista quimiotaxonômico pelo acúmulo de lactonas, triterpenos, terpenóides, flavonóides, esteróides, taninos e quinonas¹⁰. Porém, a espécie vegetal *Bauhinia forficata* é caracterizada quimicamente pela presença de flavonóides e fitoesteróis. Estudo recente das folhas desta planta resultou no isolamento e identificação de um flavonóide glicosilado (kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo) e de um fitoesterol (β -sitosterol)¹⁴.



Figura 1: Espécie vegetal *Bauhinia forficata*.

1.4 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, presente em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Apresentam um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos, que se funde ao anel A através de um oxigênio heterocíclico, resultando num esqueleto tricíclico. A figura 2 ilustra a estrutura fundamental mostrando os anéis A, B, e C e a numeração dos átomos.

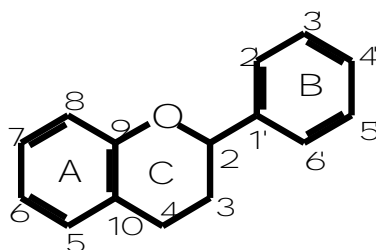


Figura 2: Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.

São conhecidos, até o presente, mais de 4200 flavonóides diferentes, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Os flavonóides de origem natural apresentam-se, freqüentemente, oxigenados e podem ser encontrados na forma livre ou

glicosilada, ou seja ligados a uma ou mais moléculas de açúcar. A unidade glicosídica pode estar ligada ao esqueleto flavonoídico de duas formas: C-heterosídeos ou ligado a um átomo de oxigênio O-heterosídeo. A forma livre é denominada de aglicona ou genina, e a glicosilada de heterosídeo.

De um modo geral, estes compostos diferem entre si pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis A, B e C, além da presença ou não da dupla ligação e da carbonila no anel C. Além dos derivados glicosilados, também encontramos flavonoides metilados, acetilados ou sulfatados⁷.

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Dentre elas podem-se citar:

- a. proteção dos vegetais contra incidência de raios ultravioletas e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias;
- b. atração de animais com finalidade de polinização;
- c. antioxidantes;
- d. controle da ação de hormônios vegetais;
- e. agentes alelopáticos;
- f. inibidores de enzimas¹⁵.

Os flavonóides são formados a partir de duas rotas biossintéticas distintas: a do ácido chiquímico o qual originará a fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico e a do acetato, via ácido malônico. Então a rota biossintética dos flavonóides se dá a partir de três moléculas de malonil-CoA e uma molécula de cinamoil-CoA. Este último é responsável pela formação do anel B e pela ponte de três carbonos e o malonil-CoA é responsável pelo anel A da flavona⁷ (figura 3).

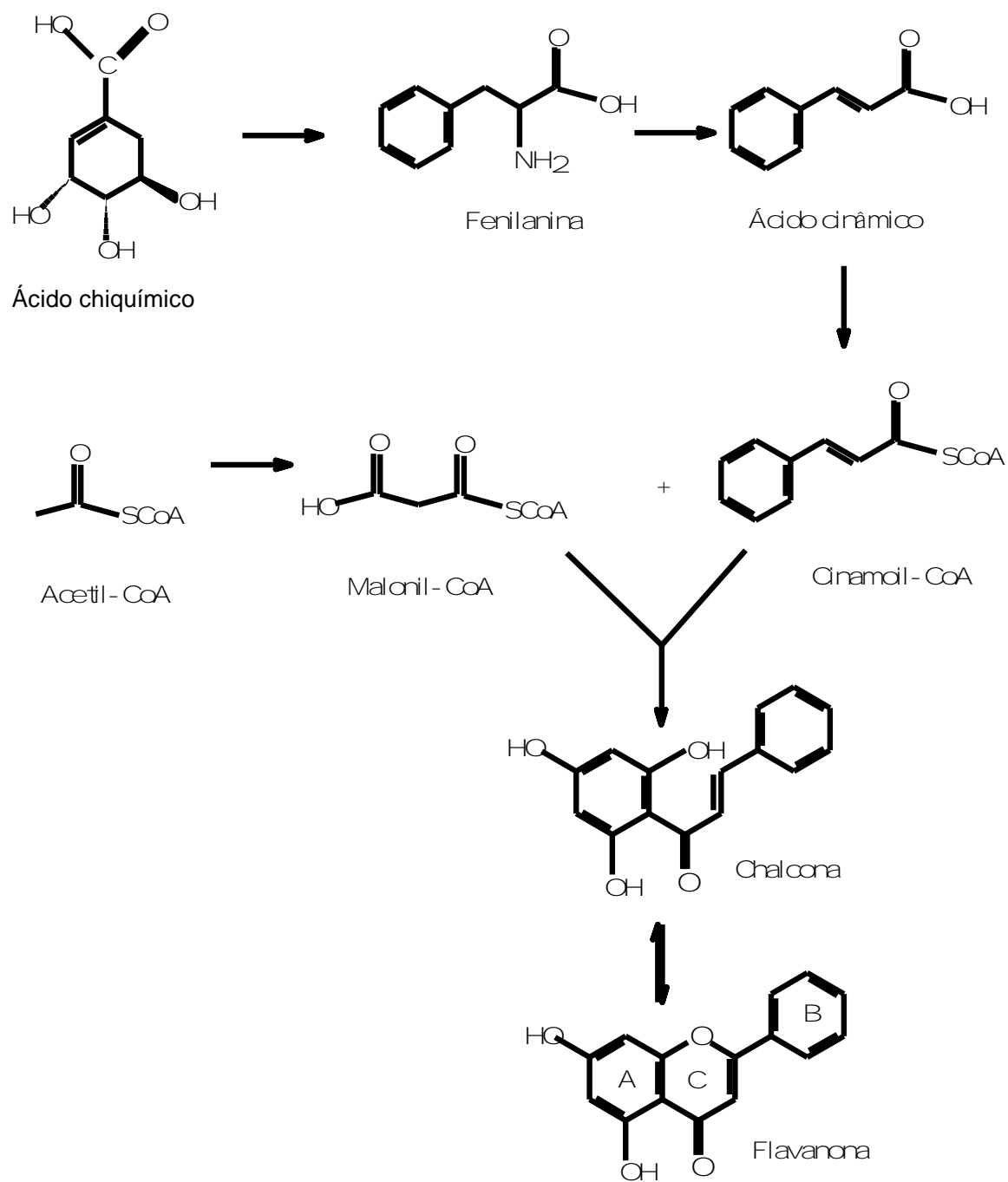


Figura 3: Esquema simplificado da rota biossintética dos flavonóides.

Na literatura esta classe de compostos apresenta importantes propriedades farmacológicas⁷, tais como: anticarcinogênico, antiinflamatório, antiviral, antidiabético, antioxidante, entre outras. Entretanto a atividade hipoglicêmica dos flavonóides é pouco conhecida.

Os primeiros relatos da atividade hipoglicêmica de *Bauhinia forficata* em pacientes diabéticos foram feitos por Carmela Juliani em 1929 e 1931¹⁷⁻¹⁸. Uma década mais tarde, Juliani demonstrou que esta espécie vegetal continha compostos capazes de diminuir a glicemia de cães e coelhos submetidos à hiperglicemia adrenalítica e pancreactomizados¹⁹. Porém, poucos relatos da atividade hipoglicêmica desta planta são atualmente encontrados na literatura²⁰, e desses relatos alguns são contraditórios ou não apresentaram efeito hipoglicêmico²¹.

Recentemente, Pepato e colaboradores (2002), verificaram que durante tratamento crônico (31 dias) o grupo diabético tratado com chá das folhas de *B. forficata* mostrou significativa redução na glicemia, nos níveis de glicose na urina e uréia na urina em relação ao grupo diabético controle²².

O estudo do extrato bruto e frações de *B. forficata* demonstrou efeito agudo sobre o nível de glicose no sangue em ratos normais e diabéticos²³.

Há registros atuais de estudos do composto campferitrina (kaemferol-3,7-O-(α)-L-diramnosídeo) isolado da espécie *Bauhinia forficata* no combate da glicemia em ratos diabéticos, assim como in vitro em ¹⁴C-glucose e ¹⁴C-leucina com incorporação em músculo de ratos²⁴.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo o estudo fitoquímico da espécie vegetal *Bauhinia forficata*.

1.4.2 Objetivos Específicos

Descrever os métodos e procedimentos utilizados para isolamento dos compostos da fração acetato de etila das folhas de *B. forficata*.

Identificação e caracterização estrutural através de análises físicas e espectroscópicas de ^{13}C e principalmente de ^1H dos compostos isolados.

Dominar e aprimorar novas técnicas de isolamento e purificação de compostos polares de origem vegetal, assim como interpretar seus espectros.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA FORFICATA* LINK

2.1.1 Materiais

Os solventes foram adquiridos de fontes comerciais e usados sem prévia purificação. As misturas de solventes foram feitas a volume por volume(v/v) e devidamente recuperados para posterior reutilização.

Nos fracionamentos e separações cromatográficas foi usado gel de sílica como adsorvente. Na cromatografia em coluna foi usado sílica gel de granulometria 0,063-0,2 mm e ou 0,04-0,063 mm para coluna cromatográfica sobre pressão (flash). Para cromatografia em camada fina (CCF) foram usadas cromatoplas de alumínio revestidas com gel de sílica 60 de 0,2 mm de espessura da marca Merck. A análise em cromatografia de alta eficiência HPLC foi feita em aparelho Shimadzu com bombas LC-10AD e coluna com dimensões de 4,6 mm diâmetro e 25 cm de comprimento com detector diodo Array SPD – MIOA vp.

O primeiro critério de pureza adotado foi a de uma única mancha na CCF analítica usando-se diferentes sistemas de eluição e revelado com vapor de iodo, FeCl_3 sob aquecimento e visualização das cromatoplas em câmara de luz ultravioleta em comprimento de onda de 254 e 365 nm.

Os pontos de fusão (PF) foram determinados em um aparelho da Microquímica APF-301 e não sofreram correções.

2.1.2 Métodos e instrumentação

2.1.2.1 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr grau espectroscópico, com leituras na região de 4000 a 400 cm^{-1} em um espectrômetro Perkin Elmer FT 16PC, na Central de Análises do Departamento de Química-UFSC.

2.1.2.2 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos a 600 MHz em aparelho Brucker DRX600. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais δ (ppm), usando-se tetrametilsilano como referencial interno e DMSO- d_6 como solvente. As áreas relativas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: s (singleto), d (duplete), t (triplete) e m (multiplete).

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos a 150 MHz em aparelho Brucker DRX 600, utilizando tetrametilsilano como referencial interno e DMSO- d_6 como solvente, e com os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais δ (ppm).

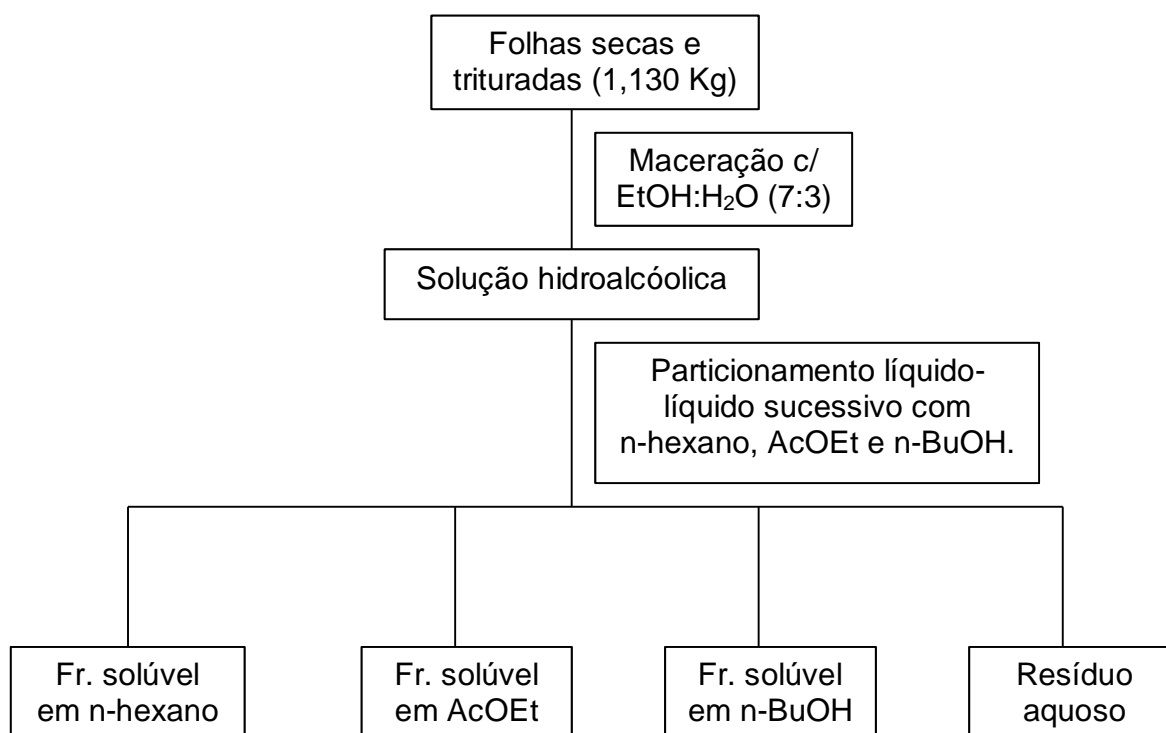
2.1.3 Coleta e identificação da planta

As folhas da espécie vegetal *Bauhinia forficata* foram coletadas em janeiro de 2005 na cidade de Orleans no sul do Estado de Santa Catarina. A planta foi identificada pelo Professor Daniel de Barcellos Falkenberg do Departamento de Botânica da UFSC, onde uma exsicata da espécie foi depositada sob número FLOR-31271.

2.1.4 Obtenção dos extratos

As folhas (1,130 Kg) foram secas em estufa sob ventilação, trituradas e submetidas a extração por maceração exaustiva com EtOH/H₂O (7:3) à temperatura ambiente. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor sob pressão reduzida a 50 °C até $\frac{1}{3}$ de seu volume inicial de forma que o solvente evaporado durante o processo fosse recuperado e retornado ao recipiente de maceração conjunto (maceração). O extrato hidroalcólico bruto foi mantido em repouso por dois dias a 4 °C. Em seguida foi filtrado para remoção de ceras e graxas e o filtrado submetido ao particionamento líquido-líquido sucessivo com n-hexano, AcOEt e n-BuOH.

Fluxograma 1



Fluxograma 1: Preparação das frações solúveis da solução hidroalcólica das folhas de *B. forficata*.

2.1.5 Isolamento dos flavonóides das folhas de *Bauhinia forficata*

A fração AcOEt (34g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) de sílica gel usando como eluente o sistema n-hexano/AcOEt/EtOH com polaridade crescente (tabela 1). Com o objetivo de evitar a poluição do meio ambiente no descarte dos solventes utilizados e por motivos de economia, executa-se o reaproveitamento destes por evaporação no rotavapor. Assim, numa coluna cromatográfica, a primeira fração colhida é reciclada indefinidamente mediante o ajuste do gradiente de polaridade. Utilizou-se uma coluna de diâmetro 6,0 cm com altura de fase estacionária 10,0 cm e pastilha ou amostra adsorvida em sílica de 2,0 cm (figura 4). Foram coletadas 110 frações de 100 mL, e reunidas conforme semelhança de seus perfis cromatográficos (CCF).

As frações que apresentaram no perfil cromatográfico uma maior perspectiva de separabilidade por cromatografia em coluna, foram recromatografadas em coluna de sílica fina sob pressão constante (coluna flash) e alíquotas de 5 mL de amostras foram coletados, seguindo todos os padrões exigidos para uma eficiente separação²⁵.

As frações coletadas de menor polaridade 1-45 (fluxograma 2) não obtiveram boa resolução em cromatografia de camada fina (CCF) por serem ésteres de cadeia longa, ácidos graxos e pigmentos clorofilicos.

A partir da fração 46 até 56 (fluxograma 2) com eluente na proporção de 80/20 AcOEt/n-hexano os compostos kaenferol e quercetina (1 e 2) (60 mg) (agliconas) foram isolados, recromatografados e submetidos a sucessivas recristalizações com acetona, porém não foi possível separa-los por possuírem fator de retenção muito próximos.

As frações 57-63 (fluxograma 2) reunidas pelo mesmo método forneceram o kaenferol-7-O-(α)-ramnosídeo (3) (40 mg) e recristalizado em AcOEt.

Os flavonóides kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo e quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo (4 e 5) apresentaram-se nas frações 70-90 (fluxograma 2) e com maior quantidade, obtendo-se aproximadamente 500 mg. A purificação realizou-se por recromatografia e posterior recristalização em AcOEt e MeOH.

No decorrer da eluição com a fase móvel na proporção de 70/30 EtOH/AcOEt observou-se a presença de um perfil cromatográfico em CCF, revelado em FeCl_3 , com valor de R_f menor no sistema de solvente AcOEt 50 : MeOH 25 : AcOH 25 (figura 5) representando um composto mais polar. As frações reunidas de 91-110 (fluxograma 2) foram recristalizadas em AcOEt e MeOH fornecendo 50 mg dos flavonóides kaenferol-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo e quercetina-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo (6 e 7). A solubilidade destas frações se tornou mais difíceis por sua alta polaridade, onde se observou um precipitado insolúvel nos solventes usados para recristalização. O precipitado foi separado do solvente por decantação e recristalizado em MeOH e H_2O proporcionando 150 mg de uma substância (8) em fase de identificação.

A pureza dos compostos foi baseada na comparação dos seus perfis cromatográficos em relação a padrões isolados e identificados neste mesmo grupo de pesquisa. Outra forma utilizada para certificação de pureza foi o método físico de ponto de fusão, baseando-se em valores com pouca variação na temperatura de mudança do estado físico dos compostos. Além de métodos práticos de CCF e PF para se determinar a pureza de uma amostra utilizou-se também técnicas sofisticadas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), IV, e RMN ^1H e ^{13}C .

Utilizou-se do método de modificação estrutural por acetilação com anidrido acético e piridina como catalisador para elucidação da estrutura do precipitado (8) que se suspeita ser um dissacarídeo por algumas análises preliminares com IV, RMN ^1H e ^{13}C . Cada um dos flavonóides O-heterosídeos 3, 4 e 6 foram

dissolvidos em EtOH-10% HCl e refluxados por 2 h. A mistura reacional resultante foi diluída com água e extraída com AcOEt. A unidade aglicona foi identificada na fase orgânica por CCF.

Tabela 1: Sistema de eluição utilizado para coluna cromatográfica da Fr. AcOEt

AcOEt	Hexano	EtOH	Frações
0	100	-	0
10	90	-	1-5
20	80	-	6-11
30	70	-	12-22
40	60	-	23-27
50	50	-	28-34
60	40	-	35
70	30	-	36-45
80	20	-	46-56
90	10	-	57
100	0	0	58-59
90	-	10	60-63
80	-	20	64-69
70	-	30	70-75
60	-	40	76-80
50	-	50	81-82
40	-	60	83-90
30	-	70	91
20	-	80	92-99
10	-	90	100-104
0	-	100	105-110

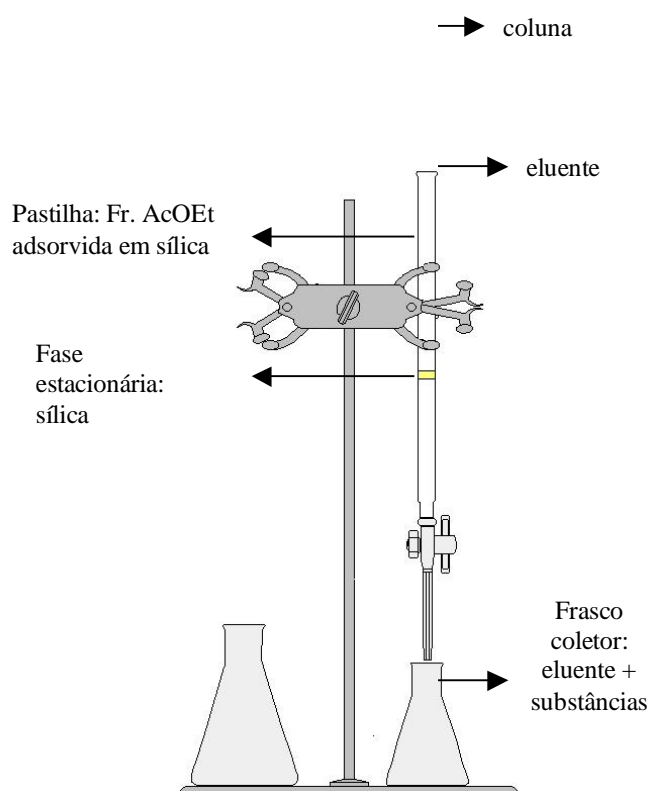
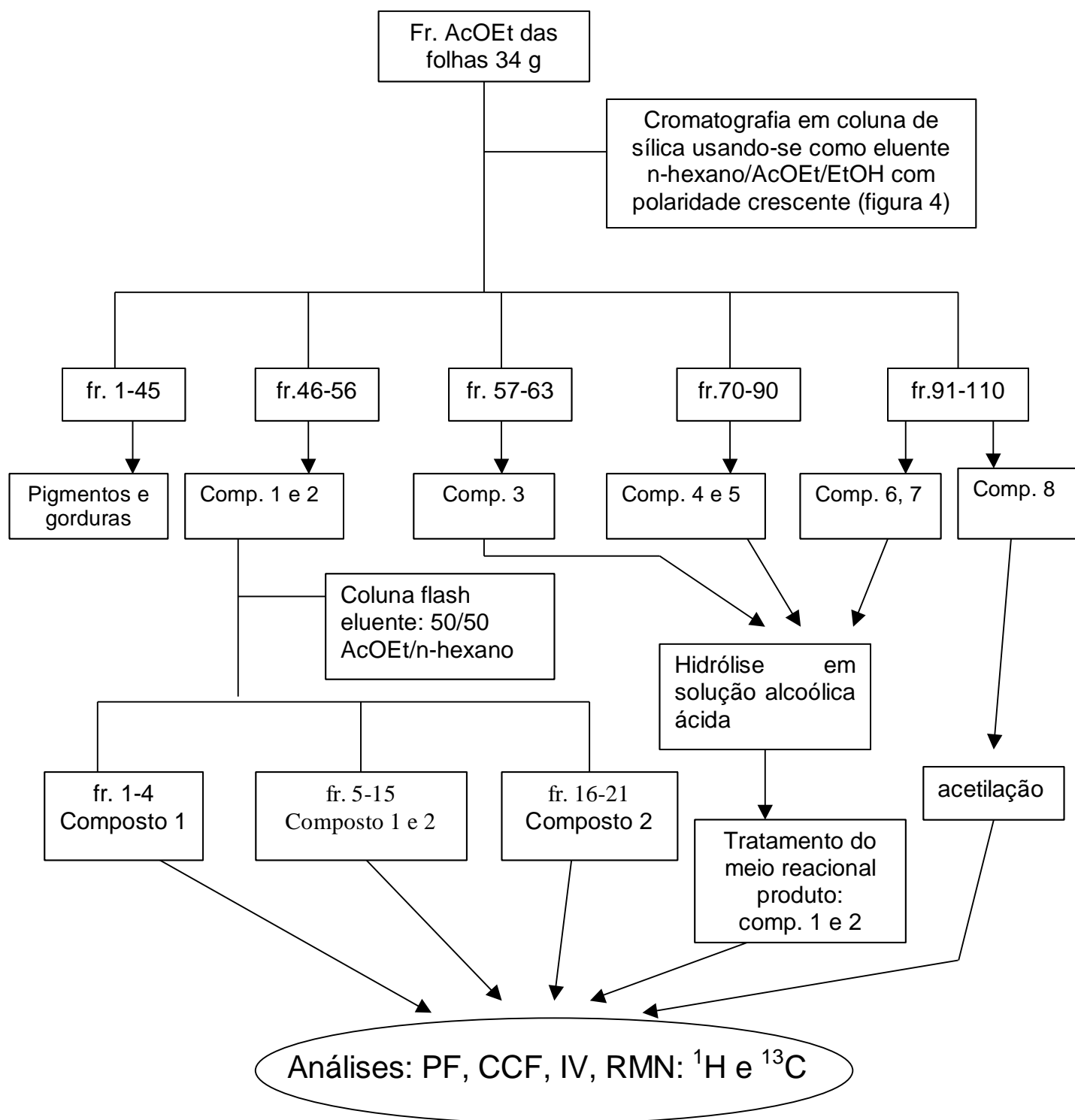


Figura 4: Representação de uma coluna cromatográfica

Fluxograma 2



Fluxograma 2: Representação esquemática do isolamento dos compostos da Fr. AcOEt.

Foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência HPLC as frações 75 antes e após purificação por recromatografia e recristalizações sucessivas. As análises foram realizadas numa coluna C-18 nas seguintes condições: volume injetado foi de 20 μL de amostra. O fluxo foi mantido a 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a eluição na forma gradiente 10-40% solvente A em B durante 23 min, contendo na bomba A acetonitrila e na bomba B 0,1 molar de ácido fosfórico pH 2,88 em temperatura de 25 °C monitorados em 340 nm durante 30 minutos.

2.1.6 Caracterização dos compostos isolados

Composto 1: kaenferol - identificado por comparação das propriedades físicas (p.f e Rf) com padrões e dados espectroscopicos com os da literatura

PF (°C): 278-280; IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3384, 1660, 1610, 1514, 1494; RMN ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): Tabela 2; RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm): Tabela 2;

Composto 3: Kaenferol-7-O-(α)-ramnosídeo - identificado por comparação das propriedades físicas (p.f e Rf) com padrões e dados espectroscopicos com os da literatura

PF (°C): 208,4-209,5; IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3322, 1658, 1590, 1554, 1496; RMN ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): Tabela 2; RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm): Tabela 2;

Composto 4: kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo - identificado por comparação das propriedades físicas (p.f e Rf) com padrões e dados espectroscopicos com os da literatura

PF (°C): 198,5-201,3; IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3340, 1650, 1592; RMN ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm): Tabela 2; RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ (ppm): Tabela 2;

Composto 6: flavonóides kaenferol-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo - identificado por comparação das propriedades físicas (p.f e Rf) com padrões e dados espectroscopicos com os da literatura

PF (°C): 184-190; IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3376, 1656, 1592, 1546, 1488; RMN ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm): Tabela 2; RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ (ppm): Tabela 2;

Composto 8: Dissacarídeo

PF (°C): - ; IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3404, 1452, 1132, 1073; RMN ¹H (CD₃OD) δ (ppm): Tabela 2; RMN ¹³C (CD₃OD) δ (ppm): (anexo);

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA FORFICATA* LINK

Os sucessivos fracionamentos cromatográficos sobre sílica gel acompanhado de recristalizações da fração solúvel em acetato de etila das folhas de *Bauhinia forficata* (Leguminosae) levaram ao isolamento dos flavonóides kaenferol e quercetina (1 e 2), kaenferol-7-O-(α)-ramnosídeo (3), kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo e quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo (4 e 5), kaenferol-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo e quercetina-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo (6 e 7) e um dissacarídeo (8) em fase de elucidação estrutural.

As estruturas e purezas dos constituintes químicos foram estabelecidas com base em cromatografia fina (CCF), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e evidências espectroscópicas, principalmente espectrometria no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono-13 (^{13}C), envolvendo inclusive comparação com dados encontrados na literatura e com padrões.

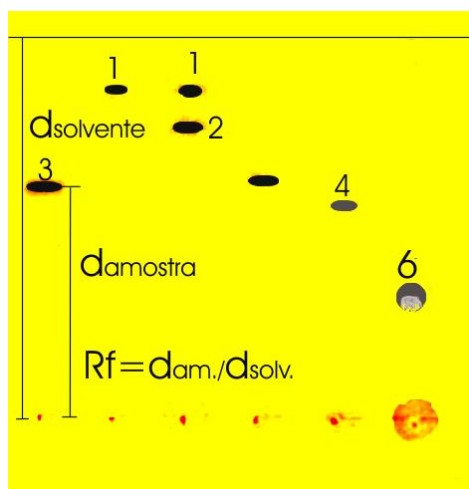


Figura 5: CCF das substâncias isoladas.

3.1.1 Identificação do kaenferol

O composto 1, isolado como um sólido amorfo amarelo com ponto de fusão 278-280 °C e R_f de 0,76, foi devidamente identificado como [5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)]-4H-1-benzopiran-3-hidroxi-4-ona, comumente chamado de kaenferol (figura 6).

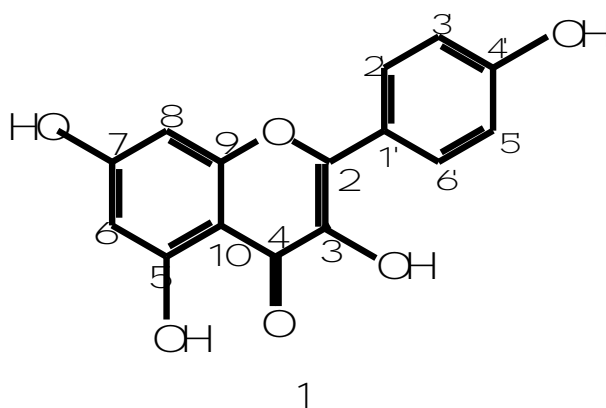


Figura 6: Estrutura química do composto 1 (kaenferol).

No espectro de infravermelho foram observadas, entre outras, bandas de absorção relacionadas a sistemas aromáticos (1610 , 1514 , 1494 cm^{-1}), à função carbonila α,β -insaturada (1660 cm^{-1}) e a grupos hidroxilas (3384 cm^{-1}).

A forma livre dos flavonóides glicosilados freqüentemente chamado de aglicona foi caracterizada como 4',3,5,7-tetraidroxiflavona após a análise do espectro de RMN ^1H , onde foram reconhecidos um par de dubletos relacionados a dois átomos de hidrogênio aromáticos que mantêm relação meta entre si e atribuídos à H-6 (δ_{H} 6,27 ppm, d, $J=2,2\text{Hz}$) e H-8 (δ_{H} 6,52 ppm, d, $J=2,2\text{Hz}$); e sinais para um sistema de spin do tipo AA'BB' típico de anel benzênico p-dissubstituído (δ_{H} 8,12 e 6,99 ppm, $J=8,8\text{ Hz}$).

3.1.2 Identificação dos flavonóides glicosilados

Os compostos 3, 4 e 6 (figuras 8,9 e 12), obtidos como sólidos amorfos com pontos de fusão e fator de retenção (Figura 5) 208.4-209.5 °C e R_f 0.56, 198.5-201.3 °C e R_f 0,48 e 184-190 °C R_f 0,32, respectivamente, apresentaram perfis na região do infravermelho semelhantes ao do composto 1, entretanto, notou-se em adicional, intensas e largas bandas relacionadas a grupos hidroxílicos (3320-3380 cm⁻¹) que rapidamente sugeriram a presença de unidades glicosídicas em suas estruturas moleculares.

Nos espectros de ressonância magnética nuclear (em anexo) de ¹H de 3, 4 e 6 estavam preservadas as absorções pertinentes à aglicona kaenferol 1; neles foram reconhecidos sinais de sistemas dos tipos AB, correspondentes a dois átomos de hidrogênio que mantêm entre si relação meta e atribuídos aos hidrogênios H-6 [δ_H 6,41 ppm, d, J= 2,2 Hz (3); δ_H 6,44 ppm, d, J= 2,2 Hz (4); δ_H 6,44 ppm, d, J= 2,2 Hz (6)], H-8 [δ_H 6,81 ppm, d, J= 2,2 Hz (3); δ_H 6,79 ppm, d, J= 2,2 Hz (4); δ_H 6,79 ppm, d, J= 2,2 Hz (6)] e AA'BB' típico de anel B de flavonóides p-dissubstituídos [δ_H 8,07 e 6,92 ppm, d, J= 8,8 Hz (3); δ_H 7,78 e 6,91 ppm, d, J=8,8 Hz (4); δ_H 8,08 e 6,86 ppm, d, J=8,8 Hz (6)]. A hidrólise ácida com solução alcoólica a 10% de HCl também contribuiu na elucidação estrutural quebrando as ligações O-heterosídeos (figura 7). A análise por CCF dos produtos fornecidos revelou a presença de kaenferol e quercetina como forma livre.

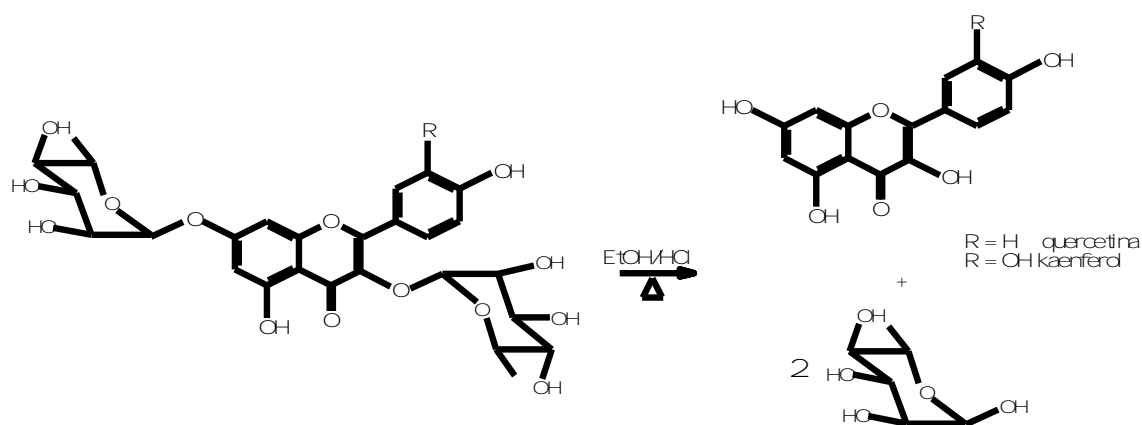


Figura 7: hidrólise ácida.

A fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{10}$ do glicosídeo (3) foi deduzida, reconhecendo os sinais correspondentes aos átomos de carbono não hydrogenados (nove carbonos quaternários sp^2 , inclusive uma carbonila em δ_C 176,09), metínicos (quatro sinais representando seis carbonos sp^2 e cinco sp^3 oxigenados, incluindo um anomérico em δ_C 98,84 ppm) e metílico (grupo metila da ramnose em δ_C 17,94 ppm). A localização da unidade glicosídica no átomo de oxigênio ligado ao carbono C-7 da aglicona baseou-se nos seguintes dados espectrais: a) o deslocamento químico do hidrogênio anomérico em δ_H 5.53 ppm (d, $J = 1,8$ Hz, hidrogênio H-1 da ramnose em posição equatorial) revelou-se compatível com a localização do açúcar na posição 7; b) o sinal em δ_H 12,45 ppm no espectro de RMN- 1H indicou a presença de HO-5, posição de absorção típica de hidroxila quelatogênica em anel de seis membros. Assim a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio (Tabela 2), baseada em análises descritas na literatura de 1D e 2D de RMN, permitiram definir a estrutura do composto 3 kaenferol-7-O-(α)-ramnosídeo, figura 8.

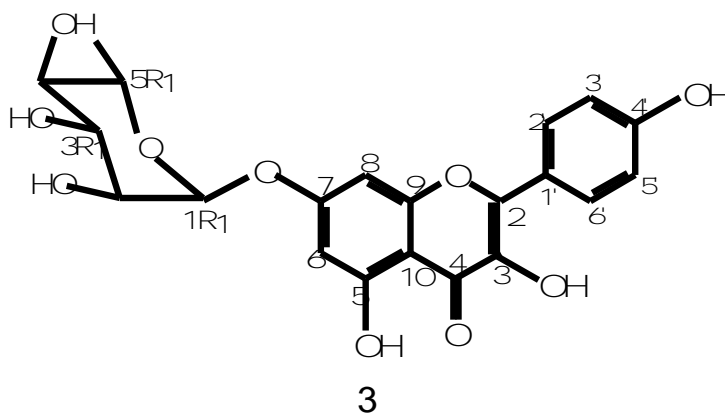


Figura 8 : Estrutura química do composto 3 (kaenferol-7-O-(α)-ramnosídeo)

O glicosídeo 4, isolado na forma de um sólido amorfo e já descrito como constituinte químico desta espécie, foi identificado como kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo (Figura 9) com base na análise dos espectros de IV, RMN ^1H e ^{13}C e na comparação dos dados espectrais com os dados do composto 3, que permitiram reconhecer a presença de uma unidade α -L-ramnose adicional ligada ao átomo de oxigênio do carbono C-3 pelo deslocamento químico do C-2 em δ_{C} em 157,77 (Tabela 2). O deslocamento químico do carbono C-2 em δ_{C} da flavona (3-hidroxiflavona) com grupo livre no C-3 aparece em torno de δ_{C} 147 ppm, como revelam as substâncias 1 e 3 (Tabela 2). Assim, a estrutura química do kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo (4) foi estabelecida, estando os seus dados espectrais em acordo com os valores descritos na literatura²⁵.

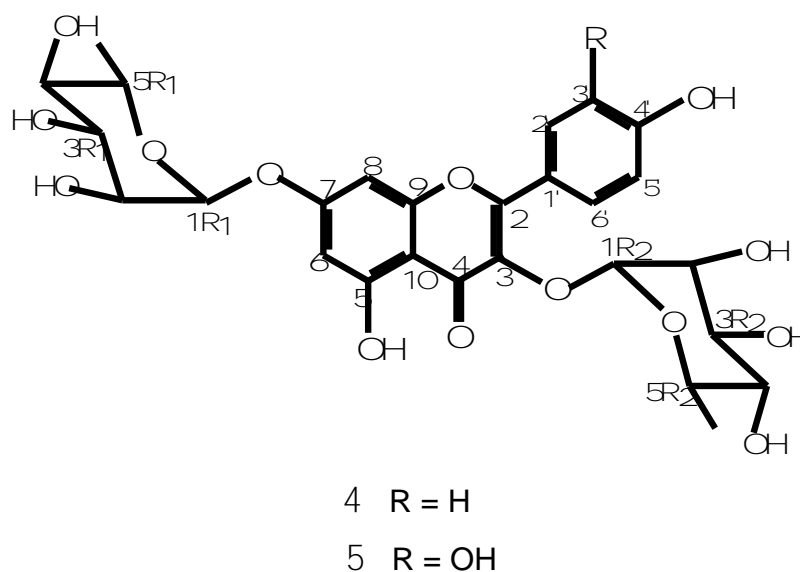
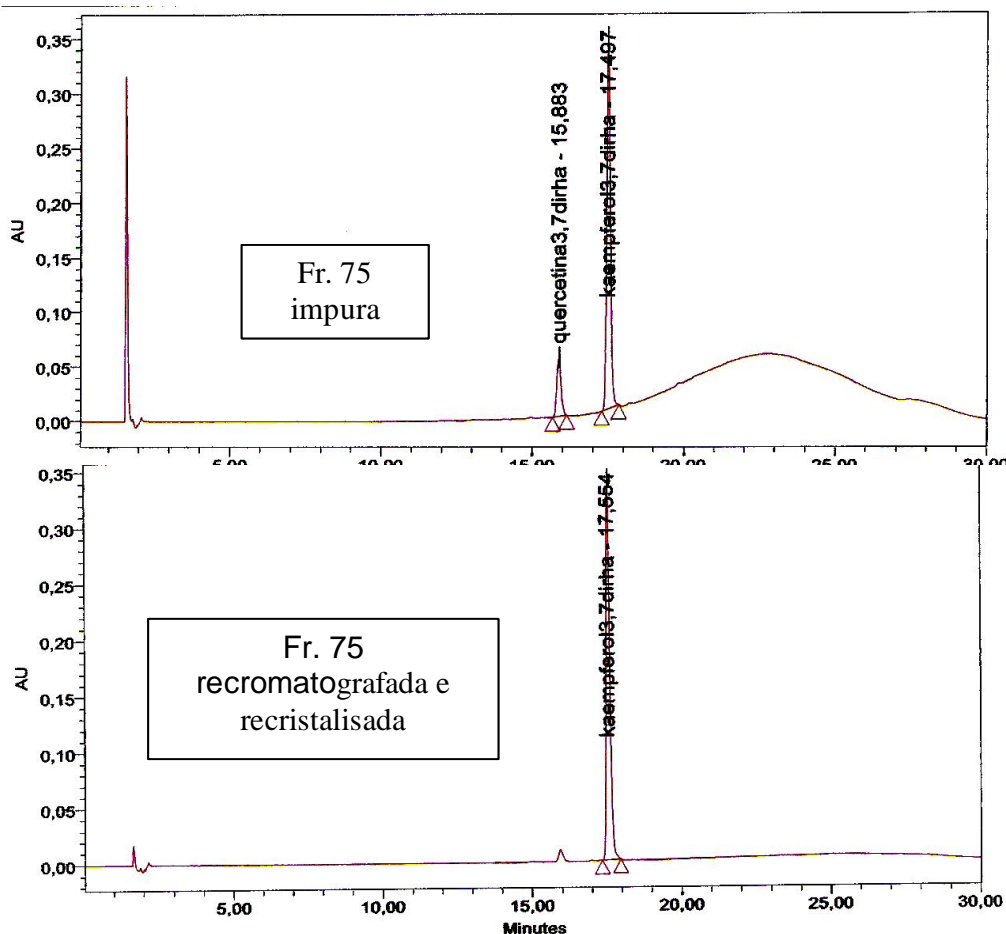


Figura 9: Estrutura química do composto 4 (kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo) e do composto 5 (quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo).

Após a caracterização e a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de 4 (Tabela 2) verificou-se a existência de sinais adicionais nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , que permitiram postular a

presença da quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo (5) (Figura 9), presente em menor percentagem. Os deslocamentos químicos dos sinais de átomos de hidrogênio em δ_H 6.43 [d, J = 2.1 Hz, H-6], 6.77 [d, J = 2.1 Hz, H-8], 6.74 [d, J = 1.7 Hz, H-2'], 6.87 [d, J = 8.3 Hz, H-5'] e 7.28 [dd, J = 8.3 e 1.7 Hz, H-6'] e de carbono em δ_C 120.58 (C-1'), 115.72 (CH-2'), 145.23 (C-3'), 148.61 (C-4'), 114.91 (CH-5') e 121.21 (CH-6') observados nos espectros de RMN 1H e RMN ^{13}C , respectivamente, permitiram deduzir a estrutura 5.

A análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) confirmou a presença em menor quantidade da quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo (5) com o kaempferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo (4) na fração 75 (Figura 10) coletada após eluição em CC (cromatografia em coluna). Após sucessivas recristalizações e recromatografia observou-se a diminuição do composto quercetina-3,7-O-(α)-diramno



Figuras 10 e 11: Comprovação por HPLC da purificação da Fr. 75

O composto **6** foi caracterizado como um kaenferol triglicosilado. As três unidades glicosídicas foram identificadas como duas ramnososes através das metilas em 17,8 ppm (^{13}C) e 1,05 e 1,12 ppm [3H, d, $J = 6,1$] (^1H) e uma glicose através do metileno em 65,25 ppm (^{13}C) e 3,60 (^1H) e com base nos demais dados espectrais de RMN ^1H e RMN ^{13}C e comparação com os dados já publicados pelo grupo. .

Assim, a estrutura deste glicosídeo foi caracterizada como kaenferol-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo (**6**) (Figura 12). O espectro de RMN ^1H de **6** mostrou a presença de sinais adicionais correspondentes a um componente minoritário contendo a quercetina como aglicona.

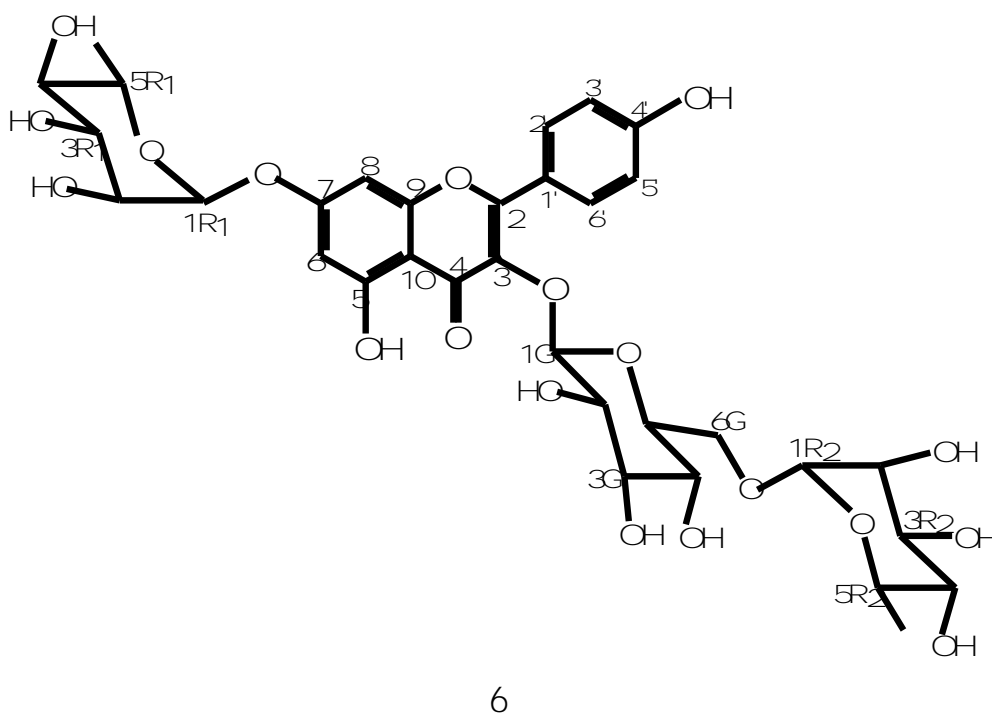


Figura 12: Estrutura química do composto **6** kaenferol-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo.

3.1.2 Identificação de um dissacarídeo

O precipitado pouco solúvel em solventes orgânicos foi recristalizado com o acréscimo de algumas gotas de água em MeOH tendo característica de um sólido amorfo branco que foi enviado para análise em IV, RMN ^1H e ^{13}C , COSY, DEPT e HMBC.

O espectro de infravermelho do composto 8 apresentou intensas bandas de absorção na região de 3384 cm^{-1} relacionadas a marcante presença de grupos hidroxilas que juntamente com as vibrações de deformação axial das ligações C—O na região de $1000\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$ são características de estruturas glicosídicas.

O espectro de hidrogênio mostrou uma série de sinais na região de 3,2 a 3,9 ppm (espectro 10 ANEXO) caracterizando sinais de hidrogênio carbinólicos típicos de açúcares. No entanto não foram observadas sinais para prótons anoméricos de carbono-13 do composto 8, mostra sinais para dois metilenos em 59,75 e 59,61 ppm atribuídos a duas unidades CH_2OH . Adicionalmente se observou nove sinais na região de 70 a 74 ppm (espectro 11 ANEXO) referentes aos grupos metínicos do açúcar. Estes dados sugerem um dissacarídeo constituído de uma unidade hexose e uma unidade pentose.

Infelizmente os resultados obtidos nas análises de RMN ^1H , ^{13}C e IV não foram suficientes para elucidar a possível estrutura do dissacarídeo em questão. As demais análises estão em andamento e são fundamentais para correlacionar os resultados de RMN ^1H e ^{13}C .

O dissacarídeo foi submetido a reação de acetilação com intuito de melhorar a resolução dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e assim obter maiores informações estruturais. O produto da reação foi analisado em IV que demonstrou o sucesso da reação. Pelas bandas de absorção no IV fica explícita a formação de

ésteres nas hidroxilas presentes na molécula. Este procedimento é utilizado como forma também de identificar a possível estrutura da molécula.

Após a reação de acetilação a forte banda de hidroxilas desapareceu e se formou entre outras bandas, uma intensa de carbonila de ésteres (1755 cm^{-1}), e em 1228 cm^{-1} característica de vibração de deformação axial C—O que se torna mais forte com a formação de ésteres.

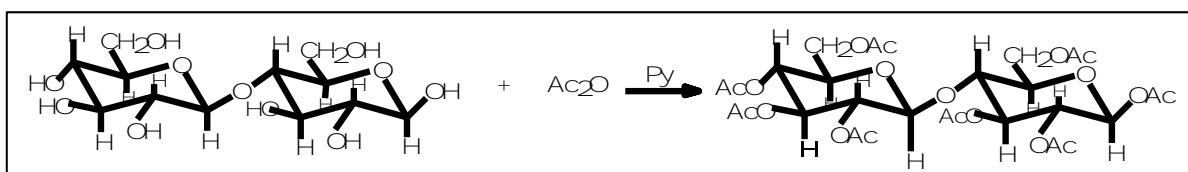


Figura 13: Acetilação de um dissacarídeo

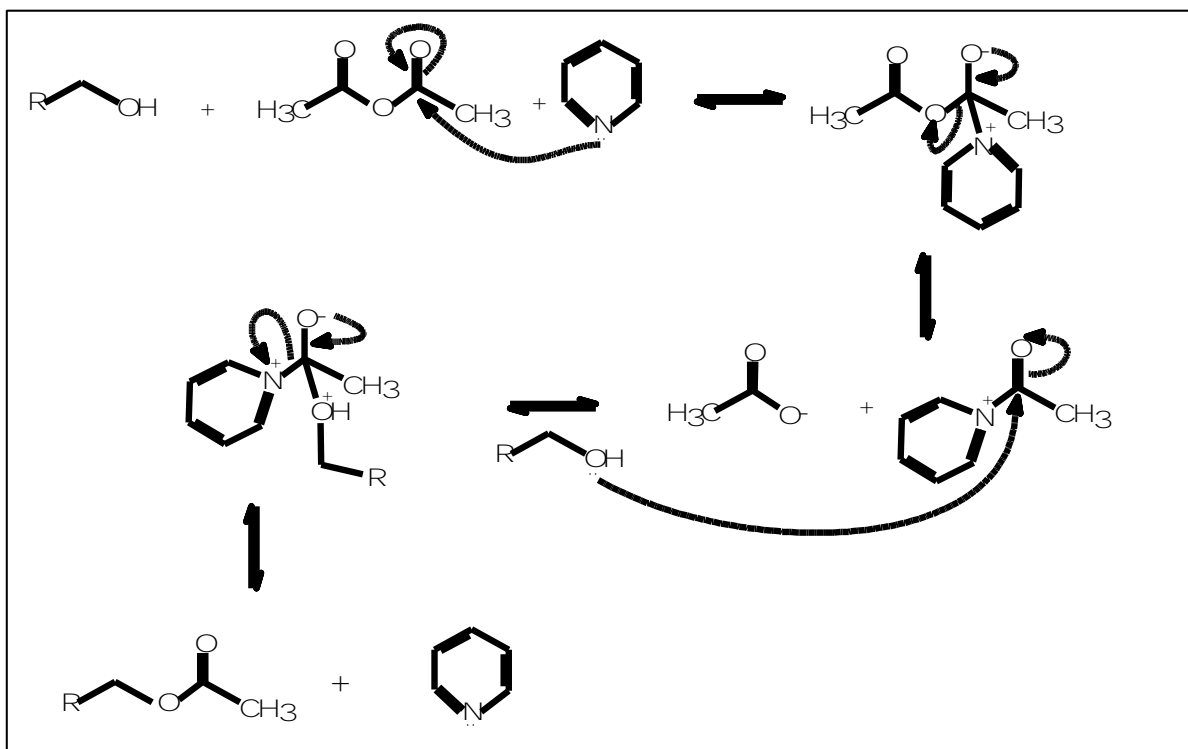


Figura 14: mecanimo da reação de acetilação.

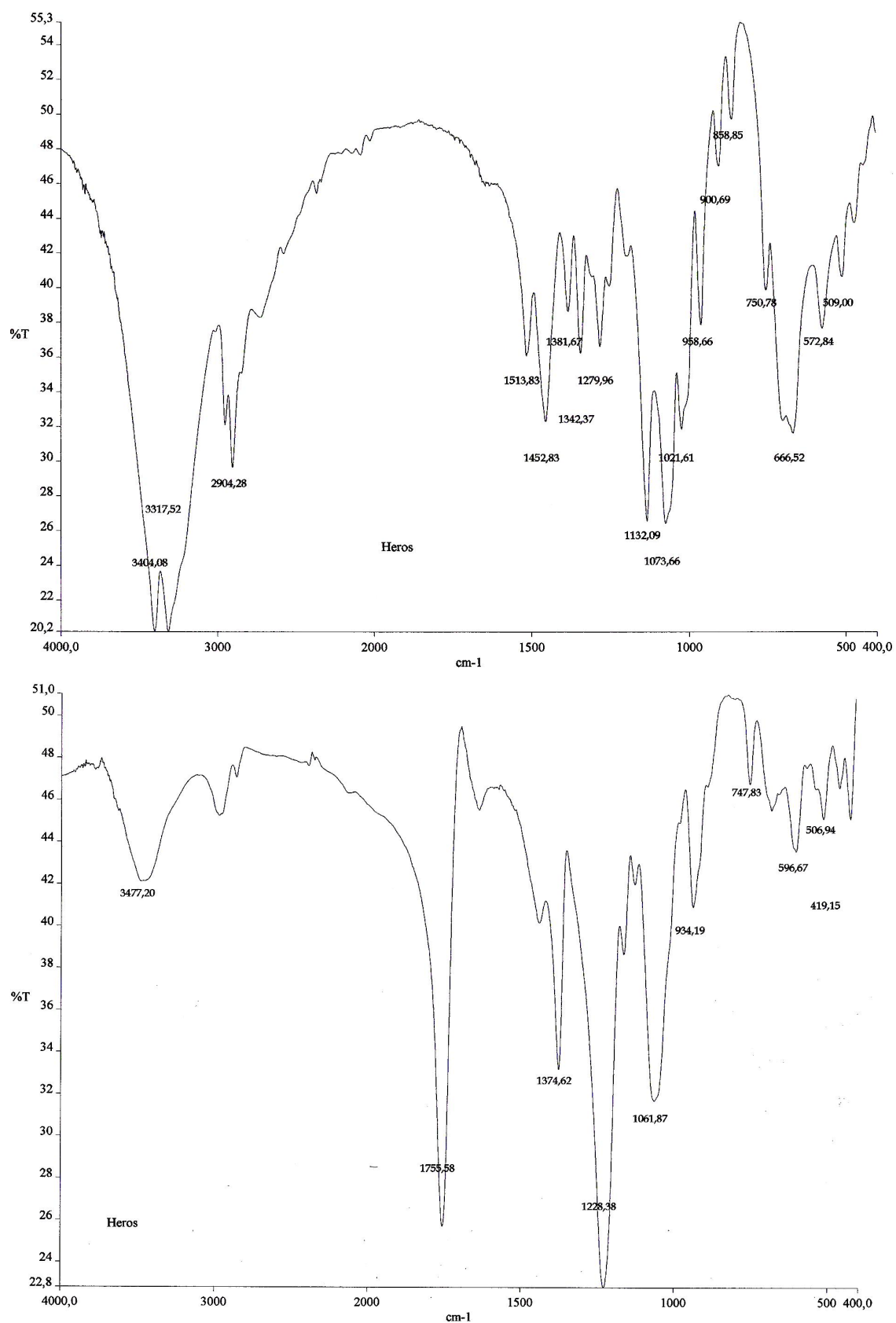


Figura 16: Espectro do produto de reação de acetilação do provável dissacarídeo

Tabela 2: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do kaenferol (1) e dos glicosídeos 3, 4 e 6, registrados em DMSO- d_6 usando aparelho e 600 MHz para hidrogênio e 150 MHz para carbono-13. Deslocamentos químicos em δ (δ_{H} e δ_{C}) e constantes de acoplamento (J, entre parênteses) em Hz. Sinais relacionados com espectros de HMBC e HMQC da literatura.

	1		3		4		6	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C								
2	-	147.0	-	147.50	-	157.77	-	157.04
3	-	136.0	-	136.05	-	134.55	-	133.53
4	-	176.6	-	176.09	-	177.92	-	177.61
5	-	162.3	-	160.39	-	160.93	-	160.80
6	6.27(d,2.2)	99.19	6.41(d,2.2)	98.39	6.44(d,2.2)	98.50	6.44(d,2.2)	99.32
7	-	165.0	-	161.42	-	161.70	-	161.61
8	6.52(d,2.2)	94.54	6.81(d,2.2)	94.36	6.79(d,2.2)	94.59	6.79(d,2.2)	94.62
9	-	157.8	-	155.75	-	157.77	-	155.99
10	-	104.1	-	104.70	-	105.79	-	105.57
1'	-	123.3	-	121.55	-	120.58	-	120.67
2', 6'	8.12(d,8.8)	130.4	8.07(d,8.8)	129.68	7.78(d,8.8)	130.68	8.08(d,8.8)	131.03
3', 5'	6.99(d,8.8)	116.3	6.92(d,8.8)	115.48	6.91(d,8.8)	115.42	6.86(d,8.8)	115.08
4'	-	160.0	-	159.39	-	160.14	-	160.11
1R1	-	-	5.53(d,1.8)	98.84	5.53(d,1.8)	98.50	5.53(d,1.6)	98.43
2R1	-	-	3.85(sl)	69.88	3.83(sl)	70.26	3.84	69.79
3R1	-	-	3.64(dl,9.0)	70.26	3.63	69.80	3.63	70.25
4R1	-	-	3.40	71.61	3.29(t,9.2)	71.61	3.30	71.59
5R1	-	-	3.45	70.09	3.44(m)	70.06	3.35	68.21
6R1	-	-	1.12(d,6.2)	17.94	1.12(d,6.2)	17.94	1.12(d,6.1)	17.85
1R2	-	-	-	-	5.29(sl)	101.91	4.39(d,1.5)	99.99
2R2	-	-	-	-	3.97(sl)	70.35	3.29	70.58
3R2	-	-	-	-	3.48(dl)	70.64	3.40	70.04
4R2	-	-	-	-	2.13(m)	72.39	3.08(dl,9.3)	71.90
5R2	-	-	-	-	3.44(m)	70.06	3.62	67.98
6R2	-	-	-	-	0.79(d,6.2)	17.45	1.05(d,6.1)	17.85
1G	-	-	-	-	-	-	5.34(d,7.7)	101.85
2G	-	-	-	-	-	-	3.38	71.07
3G	-	-	-	-	-	-	3.56	73.62
4G	-	-	-	-	-	-	3.58	70.37
5G	-	-	-	-	-	-	3.39	72.96
6G	-	-	-	-	-	-	3.60	65.25
OH								
5	12.18(sl)	-	12.45(s)	-	12.69(s)	-	-	-
3	-	-	9.50(sl)	-	-	-	-	-
4'	-	-	10.10(sl)	-	10.22(sl)	-	-	-

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA FORFICATA* LINK

Os estudos da espécie vegetal *Bauhinia forficata* teve como desafio dos pesquisadores isolar compostos bioativos em quantidades suficientes para estudos farmacológicos como o que está sendo realizado em colaboração com o Departamento de Bioquímica em relação ao efeito hipoglicêmico dos flavonóides di e triglicosilados. E também estudar o equilíbrio de complexação com metais tais como Cu^{2+} e Zn^{2+} , correlacionando da mesma forma à atividade hipoglicêmica.

Dos resultados obtidos do estudo fitoquímico da espécie vegetal *Bauhinia forficata* foram isolados: kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo 4 e quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo 5 (500 mg), kaenferol 1 e quercetina 2 (60 mg), kaenferol-7-O-(α)-ramnosídeo 3 (40 mg), kaenferol-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo 6 e quercetina-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo 7 (100 mg).

Além dos flavonóides já descritos na literatura o procedimento cromatográfico para Fr. AcOEt das folhas obteve-se um novo dissacarídeo 8 (150 mg) que não há registros nesta espécie vegetal *B. forficata*. As análises para elucidação estrutural estão em continuidade e são de fundamental importância para sua identificação.

Demonstrou-se que procedimentos cromatográficos simples são ferramentas eficientes para isolamento e purificação de compostos de produtos naturais. Procedimentos de identificação de moléculas complexas como acetilação de um dissacarídeo e hidrólise de flavonóides O-heterosídeos corroboram com os descritos na literatura.

A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se ser uma das técnicas mais sofisticadas para análise e isolamento de compostos de produtos naturais demonstrado aqui pela análise da fração 75 de uma coluna cromatográfica em sílica gel com os compostos quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo e kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo antes e após recristalização e recromatografia em coluna de sílica fina (coluna flash).

6 BIBLIOGRAFIA

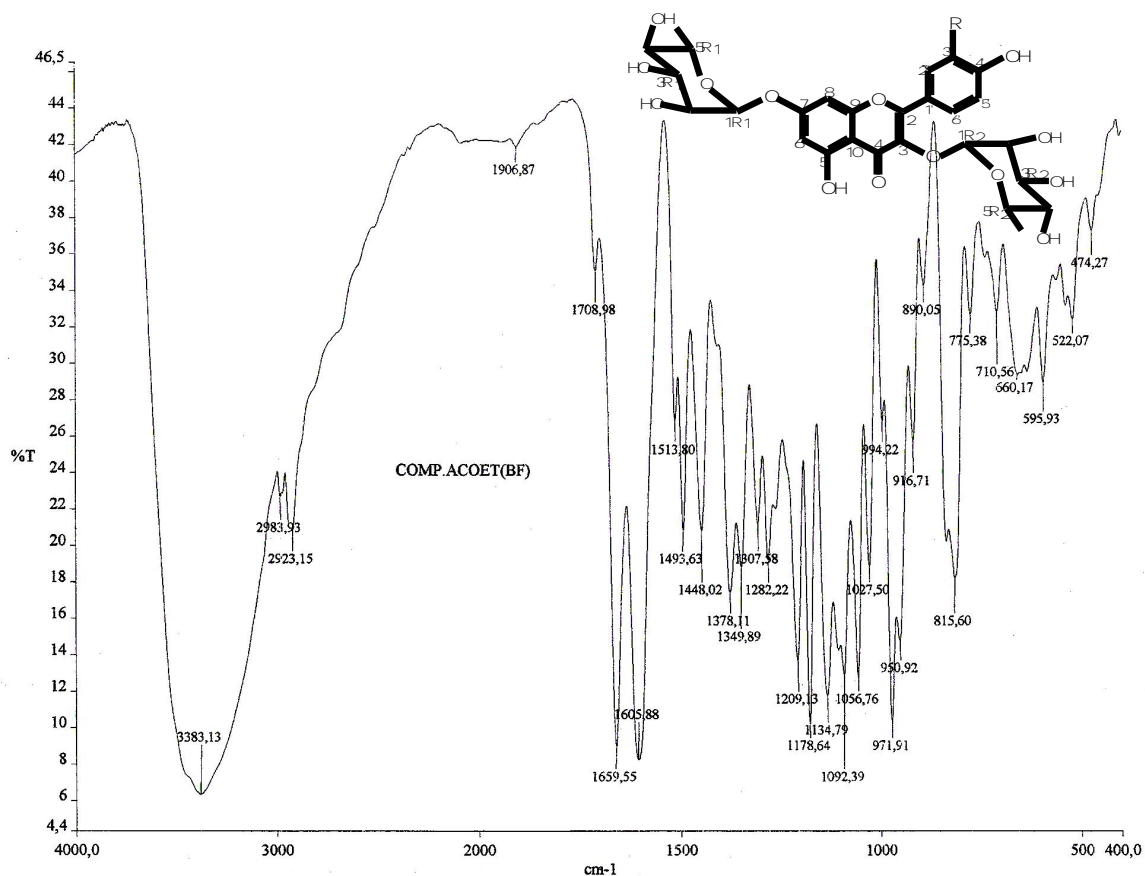
1. Akerele, O.; Herbal Gram 1993, 28, 13.
2. Veiga, V.F.J.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. Plantas Medicinais: cura segura? Química Nova 28 (3), 519-528, 2005.
3. Soejarto, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. J. Ethnopharmacol., 51, 1-15, 1996.
4. Garcia, E.S.; Silva, A.C.P.; Gilbert, B.; Corrêa, C.B.V.; Cavaleiro, M.V.S.; Santos, R.R.; Tomasini, T. Fitoterápicos. Campinas: André Tosello, 1996 17p.
5. Bermudez, J.A.Z. Indústria farmacêutica, estado e sociedade. São Paulo: Hucitec, 1995. 204p.
6. Machado, J. Recursos genéticos vegetais e a empresa de sementes. Campinas: André Tosello, 1996. 11p.
7. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R., orgs.; Farmacognosia: da planta ao medicamento; Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC: Porto Alegre/ Florianópolis, 1999.
8. Harborne, J.B. Advances in chemical Ecology. Nat. Prod. Rep.. 10 (4), 327-348, 1993a.
9. Harborne, J.B. The flavonoids in research since 1986. London: Chapman e Hall, 1993b.

10. Silva, K.L.; Cechinel-Filho, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova* 25 (3), 449-454, 2002.
11. Achenbach, H.; Stocker, M.; Constenla, M.A.F. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry* 27 (6), 1835-1841, 1998.
12. Martins, E.R.; Castro, D.M.; Castellani, D.C.; Dias, J.E. Plantas Medicinais. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1998.
13. Lorenzi, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum, São Paulo, 1998.
14. Silva, K.L.; Biavatti, M.W.; Leite, S.N.; Yunes, R.A.; Monache, F.D.; Cechinel-Filho, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae) *Zeitschrift für Naturforschung* 55, 478-480, 2000.
15. Harborne, J.B.; Eilliams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504, 2000.
16. Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 (7), 1035-1042, 2000.
17. Juliani, C. Ação hipoglicemiante da unha de vaca. *Revista Medica de Pharmacia, Chimica e Phisica* 2, 165-169, 1929.
18. Juliani, C. Ação hipoglicemiante de *Bauhinia forficata* Link. Novos estudos experimentais. *Revista Sudamericana de Endocrinologia Immunologia e Quimioterapia* 14, 326-334, 1931.
19. Juliani, C. Ação hipoglicemiante de *Bauhinia forficata* Link – Novos estudos clínicos e experimentais. *Jornal dos Clínicos* 3, 93-112, 1941.

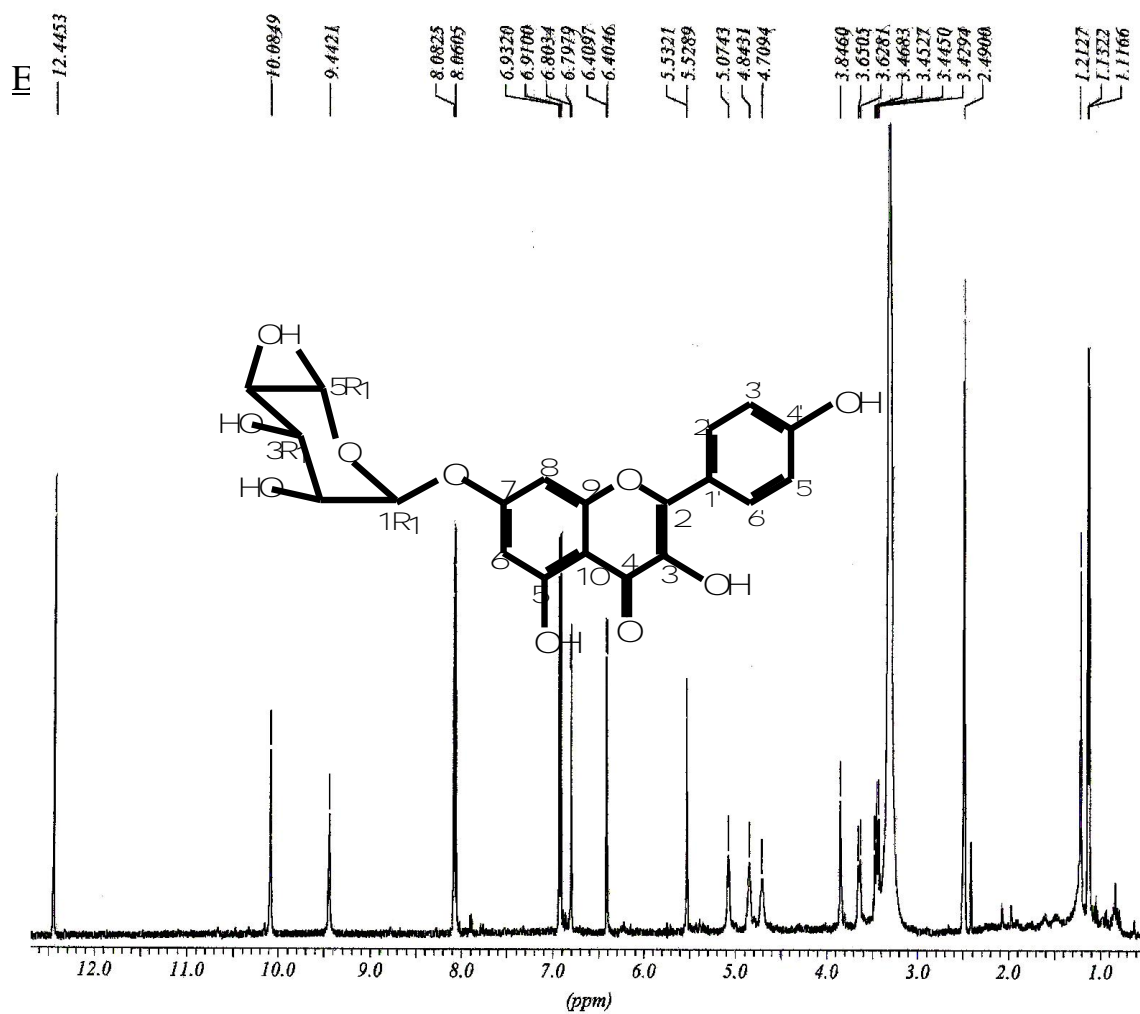
20. Russo, E.M.K.; Reichelt, A.A.J.; de Sá, J.R.; Furlanetto, R.P.; Moisés, R.C.S.; Kasamatsu, T.S.; Chacra, A.R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23, 11-20, 1990.
21. Costa, O.A. Estudo farmacológico da unha de vaca. *Revista da Flora Medicinal* 9, 175-189, 1945.
22. Pepato, M.T.; Keller, E.H.; Baviera, A.M; Kettelhut, I.C.; Vendramini, R.C.; Brunetti, I.L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 191-197, 2002.
23. Silva, F.R.M.B., Szpoganicz, B., Pizzolatti, M.G., Willrich, A.V. and Souza, E. *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 33-37, 2002
24. Jorge, A.P.; Horst, H.; de Souza, E.; Pizzolatti, M.G.; Silva, F.R.M.B. Insulinimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ^{14}C -glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions* 149, 89-96, 2004.
25. Clark, W.S.; Kahn M.; Mitra, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.*, 43, (14), 2953-2955, 1978.
26. Aragão, P.C.A.; Toledo, J.B.; Moraes, A.A.; Braz-Filho, R. Substâncias naturais isoladas de *Stigamaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Química Nova*, 13 (4), 254-259, 1990.

ANEXO
Coleção de espectros

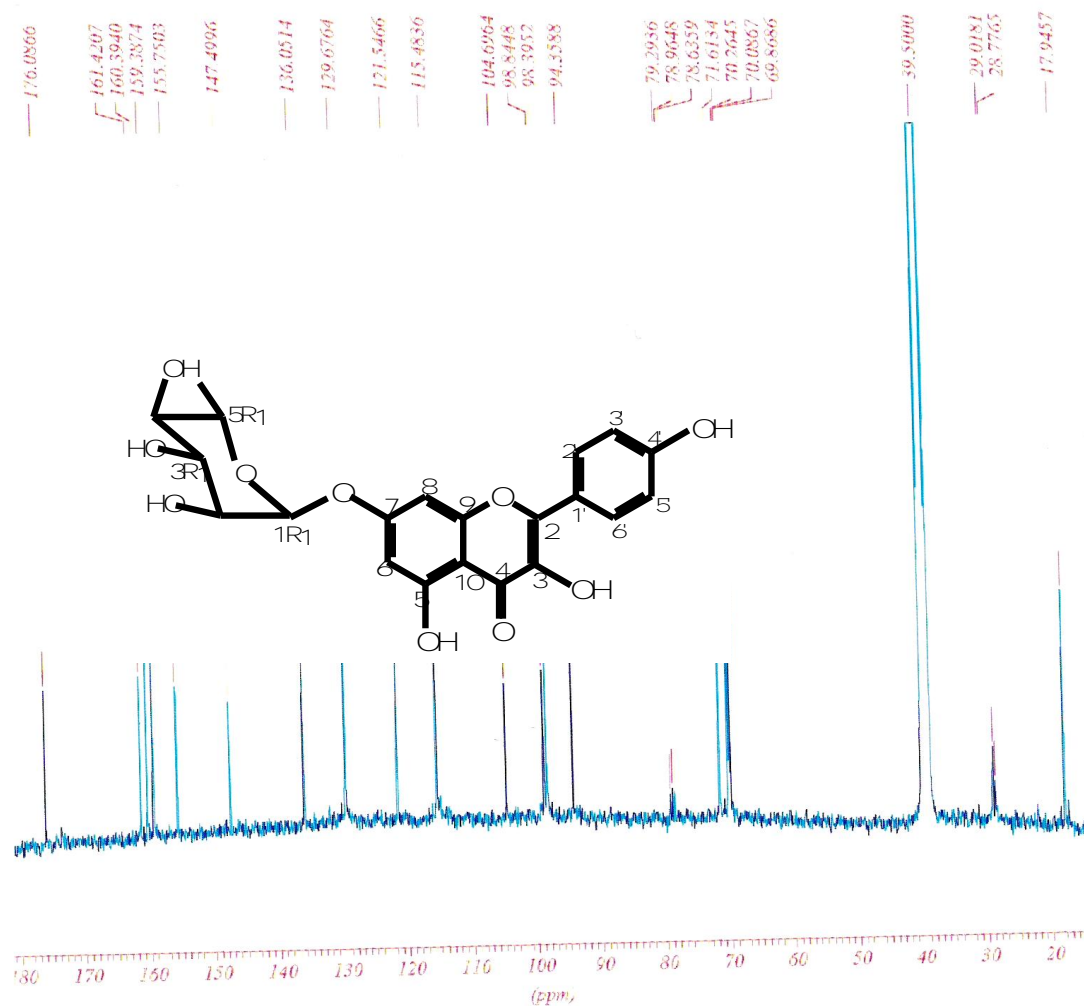
Espectro 1



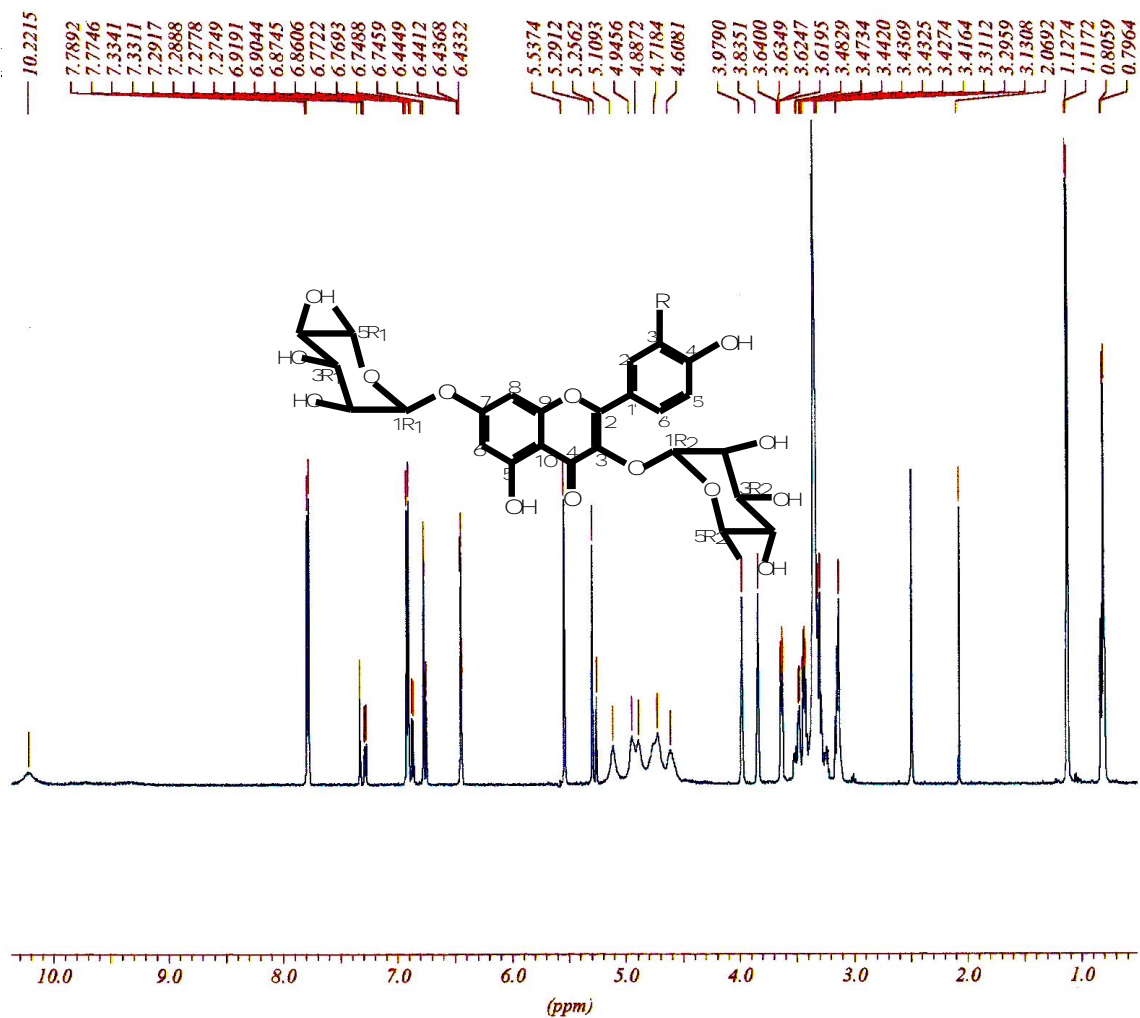
Espectro de IV, em pastilha de KBr, kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo (4), que seguem as mesmas características para os outros flavonóides isolados



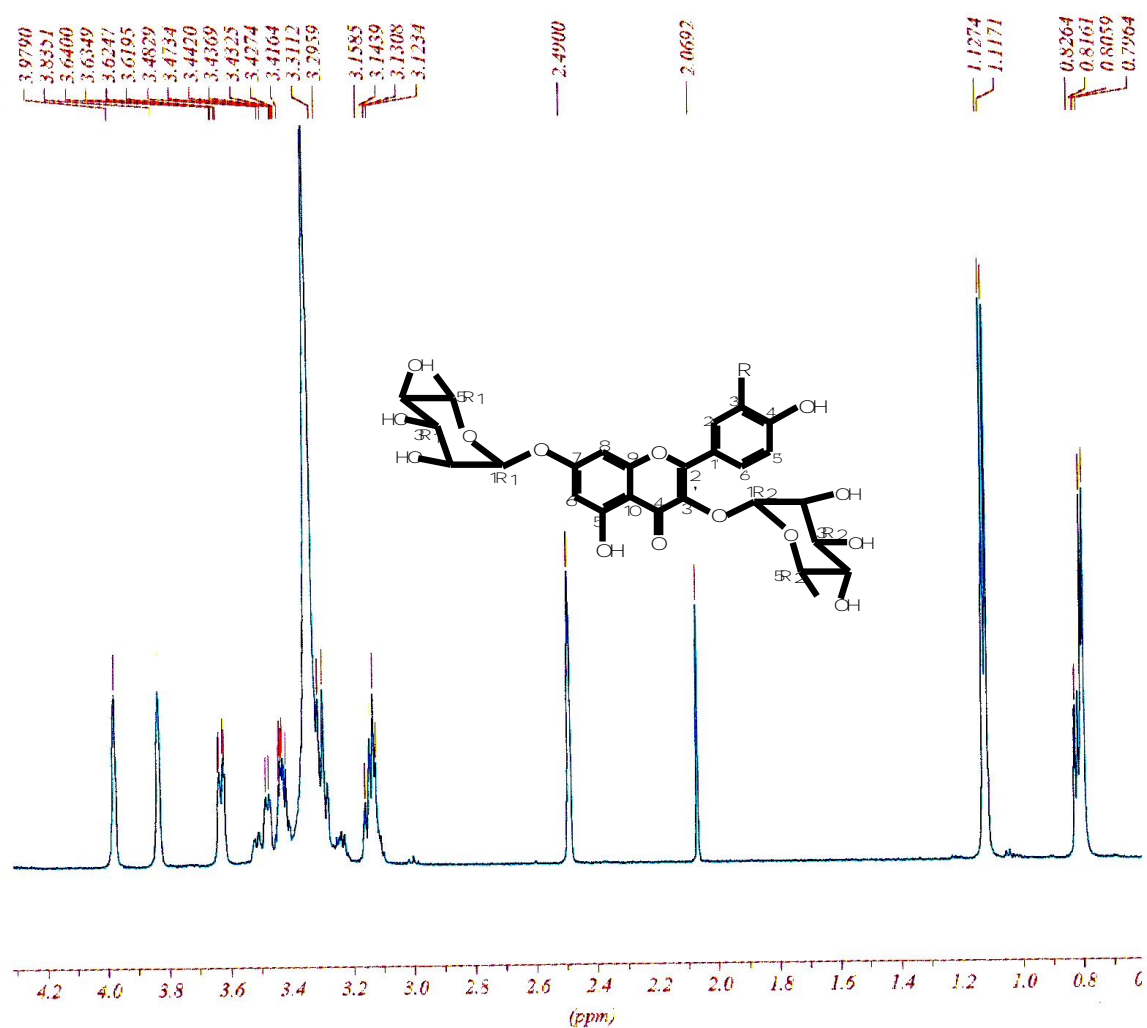
Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) do kaenferol-7-O-(α)-ramnosídeo (3)



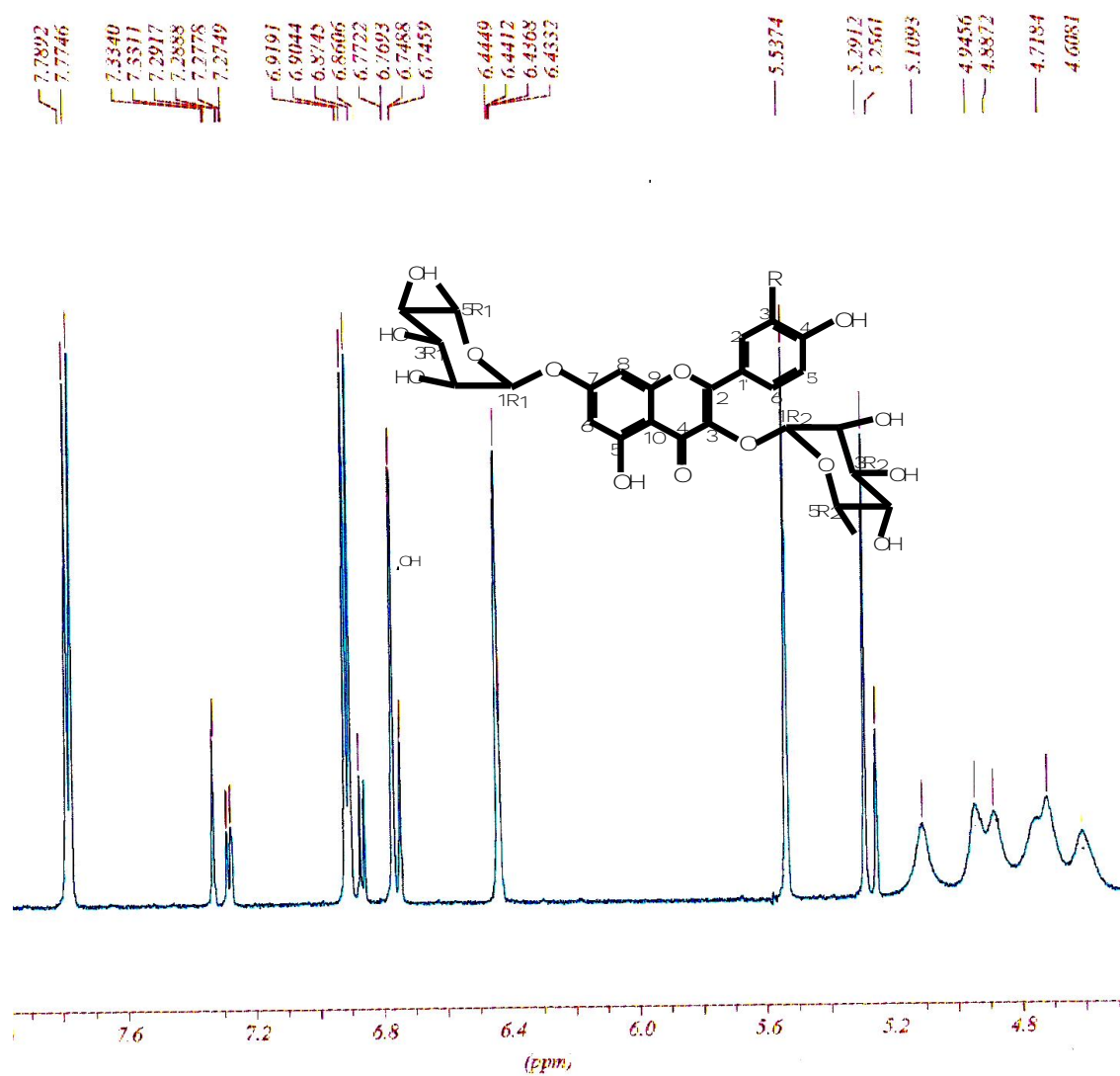
Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) do kaempferol-7-O-(α)-ramnosídeo (3)



Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo (4) e da quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo (5).

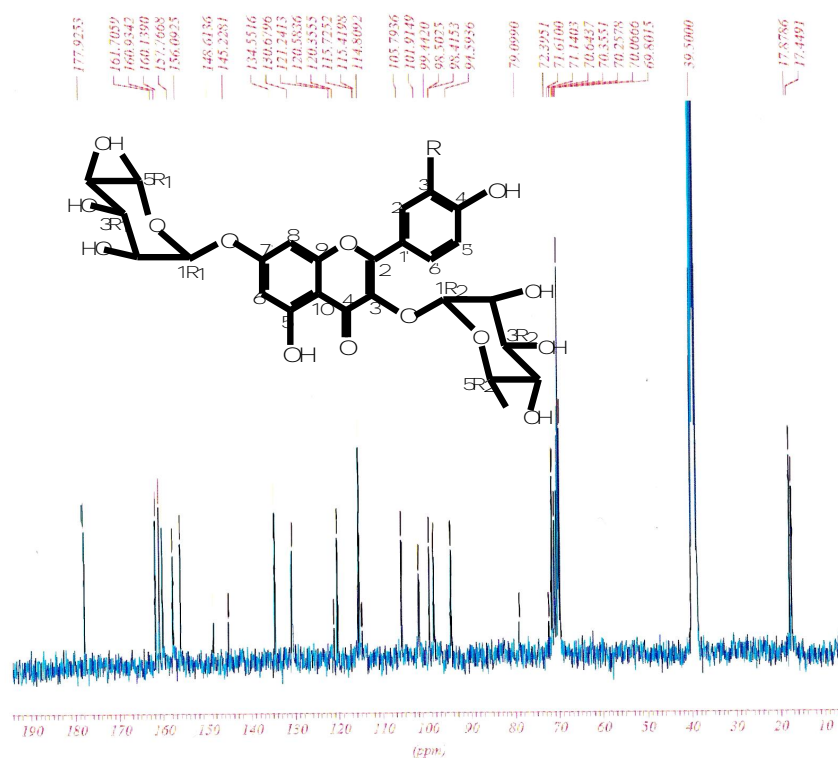


Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) do kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo (4) e da quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo (5).



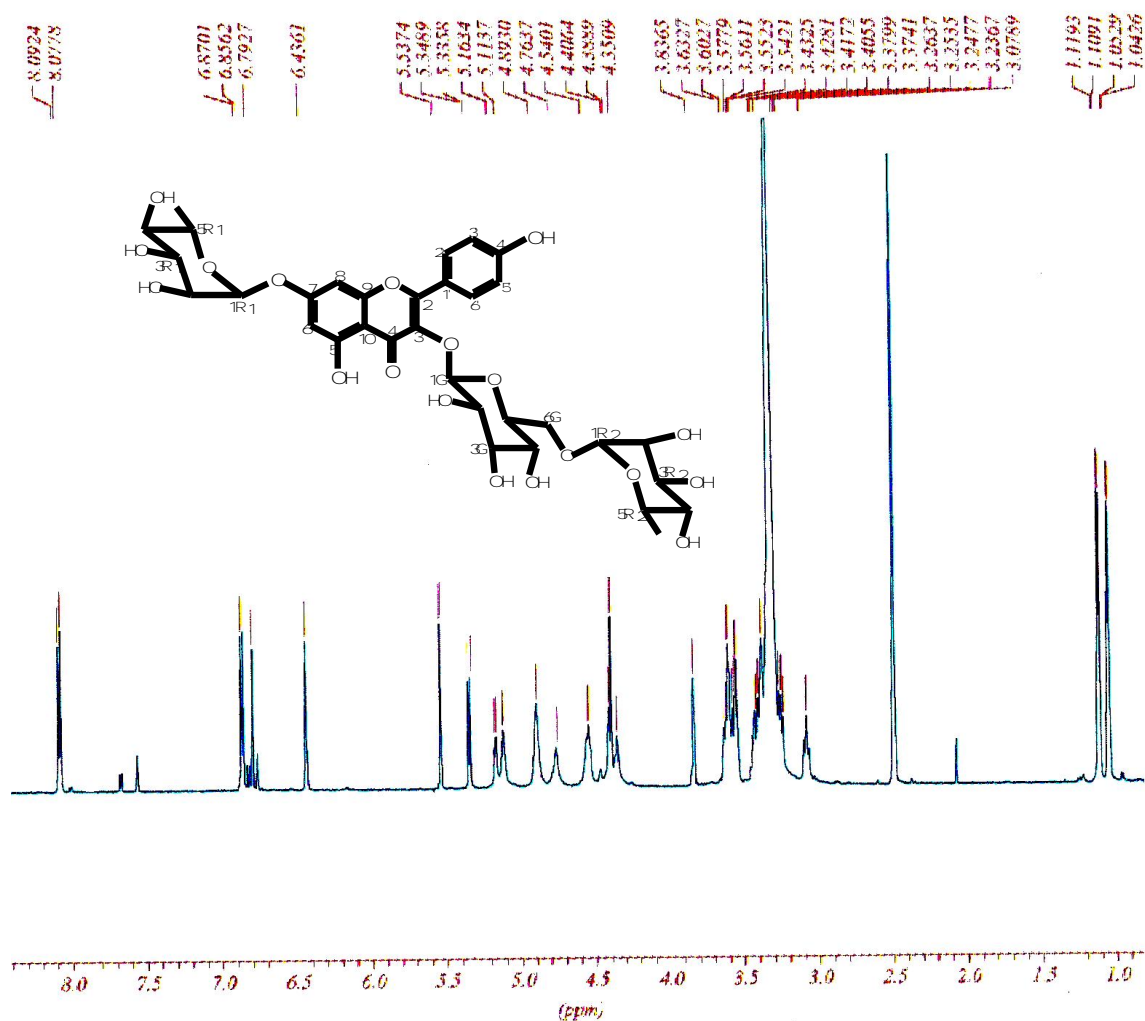
Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) do kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo (4) e da quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo (5).

Espectro 7



Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) do kaenferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo (4) e da quercetina-3,7-O-(α)-diramnosídeo (5).

Espectro 8



Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do kaerferol-3-O-(α)-glucosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo, quercetina-3-O-(α)-glucosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo

Chemical structure of compound 1 is shown above the spectrum. The structure is a complex molecule with multiple rings and functional groups, including a carboxylic acid group and several hydroxyl groups. The carbon atoms are numbered 1 through 16.

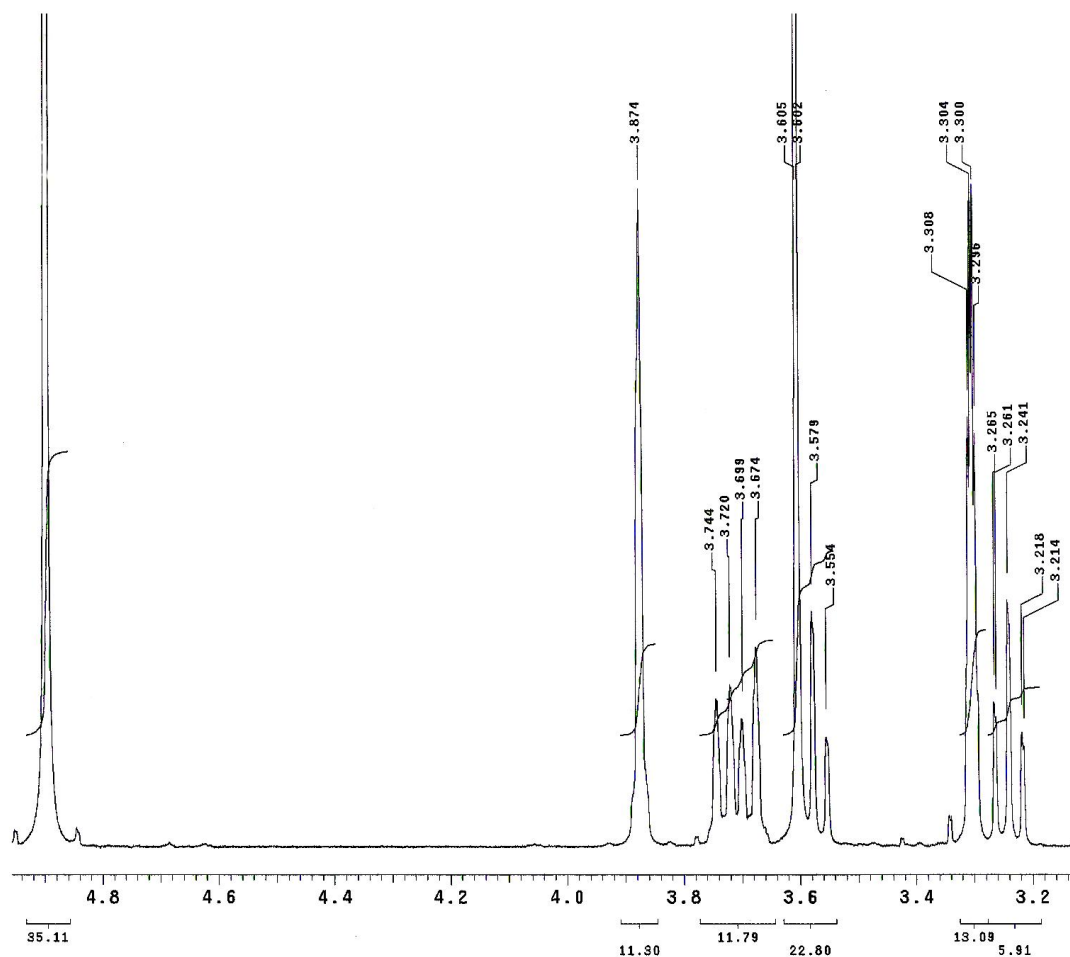
¹³C NMR spectrum (ppm) of compound 1. The spectrum shows peaks corresponding to the carbon atoms in the structure, labeled with their respective numbers (1-16). The x-axis ranges from 180 to 20 ppm.

Peak list (ppm):

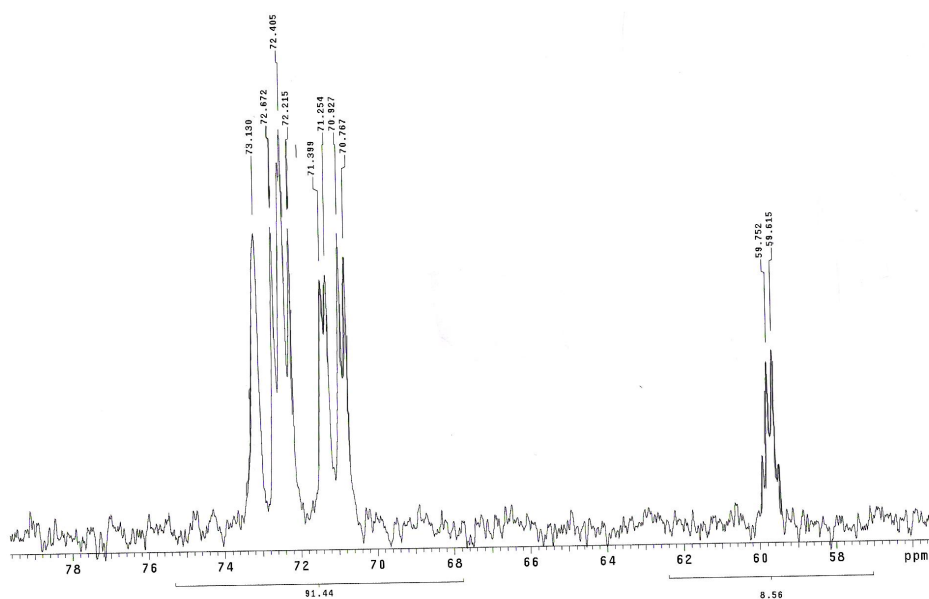
- 177.6132
- 161.6119
- 160.8369
- 160.1125
- 157.0455
- 155.9915
- 146.5119
- 144.7953
- 133.5551
- 131.0353
- 120.6742
- 115.0843
- 105.5687
- 101.8477
- 99.9990
- 99.3212
- 98.4287
- 94.6205
- 75.6164
- 72.9555
- 71.8983
- 71.5966
- 71.0732
- 70.5799
- 70.3766
- 70.2545
- 70.0504
- 69.7948
- 68.2145
- 67.9762
- 65.2484
- 39.7089
- 39.5000
- 39.2920
- 17.8484

Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) do kaenferol-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo, quercetina-3-O-(α)-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-(α)-ramnosídeo

Espectro 10

Espectro de RMN ^1H (400 MHz CD_3OD) do dissacarídeo.

Espectro 11

Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do dissacarídeo